

Resposta inflamatória do pulmão na ventilação espontânea monopulmonar. Estudo experimental no coelho.

Humberto José da Silva Machado

Dissertação de Doutoramento em Ciências Médicas

2015

Resposta inflamatória do pulmão na ventilação espontânea monopulmonar. Estudo experimental no coelho.

Humberto José da Silva Machado

Dissertação de Doutoramento em Ciências Médicas
2015

Tese de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Médicas submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Prof. Doutor Álvaro Moreira da Silva

Coorientador – Prof. Doutor Artur Águas

De acordo com a Lei (artigo 34º do Decreto Lei nº 115/2013), apresento de seguida a lista de artigos originais que foram publicados (ou estão em processo de publicação), e cujos conteúdos fazem parte desta dissertação de doutoramento.

Artigos publicados

Machado HS, Sá P, Nunes CS, Couceiro A, da Silva ÁM, Águas A. Spontaneous one-lung ventilation increases the lung inflammatory response: an experimental pilot study. J Anesth Clin Res 2014. 5:428

Machado HS, Nunes CS, Sá P, Couceiro A, da Silva ÁM, Águas A. Increased lung inflammation with oxygen supplementation in tracheotomised spontaneous breathing rabbits: an experimental prospective randomized study. BMC Anesthesiology 2014.14:86

Artigo aceite para publicação em J Anesth Clin Res

Machado HS, Nunes CS, Sá P, Couceiro A, Águas A, da Silva ÁM. Oxygen increases lung inflammatory response in spontaneous one-lung ventilation in rabbits: a prospective randomized experimental study

Agradecimentos Institucionais

- Ao *Prof. Doutor Álvaro Moreira da Silva*, pelo seu apoio incondicional e amizade.
- Ao *Prof. Doutor Artur Águas*, pelo seu incentivo, ensinamentos e amizade.
- À *Dr.ª Paula Sá*, pela sua inestimável ajuda na edição das publicações, incentivo permanente e amizade.
- À *Prof. Doutora Catarina Nunes*, pela sua ajuda na análise estatística de resultados, edição de artigos e confiança demonstrada.
- Ao *Dr. António Couceiro*, pela sua ajuda insubstituível e experiência na avaliação dos resultados histológicos encontrados.
- Ao *Prof. Doutor António Sousa Pereira*, pela sua palavra de incentivo, e amizade.
- À *Dr.ª Fernanda Nunes*, pelo seu apoio enquanto Diretora do Serviço de Anestesiologia na apresentação inicial deste projeto, incentivo e amizade.
- Ao *Dr. Júlio Guimarães*, pelo seu incentivo inicial, apoio constante e amizade.
- Ao *Prof. Doutor Lafuente Carvalho*, pela sua ajuda na concretização de etapas fulcrais neste trabalho.
- A todos os colaboradores do Departamento de Anatomia Normal do ICBAS, que possibilitaram a execução técnica dos trabalhos,

designadamente: Prof. Doutora Paula Ferreira, Prof. Doutora Maria Rodrigues, Sr. Costa e Silva, Dr.^a Madalena Costa, D. Ana Pinto e D. Manuela Silva.

- Aos Colegas da Equipa de Urgência, pela ajuda na compatibilização de horários que permitiram levar a cabo este trabalho, *Dr.^a Teresa Branco, Dr. Carlos Mexedo, Dr.^a Cátia Mascarenhas, Dr.^a Lara Marcelo, Dr.^a Teresa Leal, Dr. Gil Rodrigues, Dr.^a Blandina Gomes, Dr.^a Marta Araújo.*
- Ao Prof. Doutor Marcus Schultz, pela oportuna e fulcral ajuda na edição das publicações.
- Ao Dr. António Marques, pela sua amizade, apoio e ajuda com a escrita das publicações.
- À D. Ana Paula Pereira, pela ajuda administrativa e apoio no decurso deste programa de estudos.
- À Eduarda Lopes e à Sofia Carvalho, pela sua ajuda, amizade e confiança ao longo do percurso deste projeto, durante a direção do Serviço de Urgência do Centro Hospitalar do Porto.
- À Olga Morais, pela sua inestimável e pronta colaboração nas tarefas do Serviço de Anestesiologia do Centro Hospitalar do Porto, que permitiu o tempo necessário à efetivação do trabalho em laboratório e edição dos vários textos e publicações.
- Ao Centro Hospitalar do Porto pelo apoio logístico necessário para a execução do trabalho experimental e à Associação de Apoio ao Serviço de Anestesia do Hospital Geral de Santo António (AASAHGSA) pelo apoio na publicação dos artigos.

Agradecimentos pessoais

À família, *Maria Luísa Sousa, Nuno Vicente Sousa Machado, Diogo José Sousa Machado e Leonilde Melo*, pela compreensão e apoio ao longo de todo o projeto.

Resumo

Introdução

Complicações pulmonares pós-operatórias ocorrem com frequência diferente nos vários tipos de cirurgia, mas com especial preponderância e risco após cirurgia pulmonar.

Nos últimos anos tem existido uma especial preocupação com os síndromes de déficit de trocas gasosas, associados a respostas inflamatórias pulmonares exuberantes, aglutinados na entidade lesão pulmonar aguda (ALI – acute lung injury) e na sua forma mais grave o ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome).

Vários fatores contribuem para estas situações, nomeadamente o passado clínico do doente e suas co-morbilidades, a extensão da manipulação cirúrgica, o grau de remoção de tecido pulmonar, o tipo de ventilação usada, em particular se a ventilação monopulmonar for adotada, e a fração de oxigénio inspirada que se utilizou.

Esta dissertação investigou qual o papel da ventilação monopulmonar na resposta inflamatória pulmonar, e a possível contribuição para esta resposta de frações inspiradas de oxigénio supra fisiológicas.

Materiais e métodos

Foi escolhido um modelo animal em coelhos New Zeland (*Oryctolagus cuniculus*), em que foram excluídos potenciais fatores de enviesamento, designadamente: a ventilação controlada, a manipulação cirúrgica, e o uso de dispositivos intrapulmonares para exclusão pulmonar. Esta forma de abordagem experimental permitiu que, aos resultados que viessem a ser obtidos, se pudesse atribuir a devida importância e eventual relevância clínica. Foram realizadas três séries de estudos em que se empregou a ventilação monopulmonar, mantendo sempre a ventilação espontânea. No final dos procedimentos foi colhido tecido pulmonar dos animais estudados e preparados cortes histológicos para avaliação em microscopia ótica.

Resultados

Na primeira série de coelhos (n=20) submetidos a ventilação monopulmonar observou-se que havia inflamação significativa ($p < 0,05$) de nível moderado, pelos critérios histológicos previamente acordados. Nesta série observou-se uma predominância de eosinófilos (cerca de 75%), relativamente aos neutrófilos, com cerca de 25%.

Na segunda série de coelhos (n=20), os animais foram submetidos a suplementação de oxigénio sem qualquer exclusão pulmonar. Neste grupo de animais obteve-se uma razão de possibilidades (odds ratio) de 16 (IC 1.8-142.3), relativamente à presença inflamação moderada neste coelhos. A predominância celular

encontrada foi de eosinófilos (aproximadamente 80%) relativamente aos neutrófilos (cerca de 20%).

Na terceira série (n=20) de coelhos, os animais foram sujeitos tanto a suplementação de oxigénio como a ventilação monopulmonar. Nestes animais foi concluído que a suplementação de oxigénio causou significativamente ($p<0,001$) inflamação mais marcada, do que em coelhos que foram ventilados apenas com ar ambiente. Acresce que, também neste grupo de coelhos, a resposta inflamatória se expressou por uma proporção elevada de eosinófilos (cerca de 75-80%), com apenas de 20-25% de neutrófilos.

Discussão

Os nossos resultados indicam que a ventilação monopulmonar, causando atelectasia, pode conduzir a resposta inflamatória no pulmão excluído, dado o ambiente hipóxico local que a exclusão gera.

Observamos também que utilização de oxigénio numa fração inspirada supra fisiológica gera, por si só, áreas de atelectasia de reabsorção que pode contribuir para um ambiente ácido, favorecendo a manutenção e mesmo estimulando o processo inflamatório.

A junção de um fator flogístico para o pulmão como o oxigénio, a outro que também favorece a inflamação local, como a ventilação monopulmonar, explica o essencial dos nossos resultados experimentais com o coelho.

O predomínio de eosinófilos na resposta inflamatória pulmonar, achado algo inesperado, é corroborado pela literatura, uma vez que estudos anteriores têm associado este tipo de células a ambientes hipóxicos e acídicos.

Conclusões

A ventilação espontânea monopulmonar, por si só, é um fator indutor de resposta inflamatória pulmonar, quando comparada com ventilação espontânea bipulmonar.

A suplementação com oxigênio, em ventilação espontânea, seja em ventilação bipulmonar ou monopulmonar, aumenta a intensidade da resposta inflamatória local.

A anestesia para cirurgia torácica, quando utiliza ventilação monopulmonar deverá, sempre que possível, evitar fatores adicionais de inflamação pulmonar, com o objetivo de diminuir as complicações relacionadas com esta resposta inflamatória indesejada.

Abstract

Introduction

Postoperative pulmonary complications have different frequencies according to the type of surgery, with a special preponderance or risk after pulmonary or thoracic surgery.

Over the last years there has been a significant trend on the appearance of gas exchange syndromes, as postoperative pulmonary complications, associated with exuberant lung inflammatory diseases, like ALI and ARDS.

In this regard, several factors have been implicated, namely: the patient disease background, the extent of lung manipulation and surgical removal, and the type of ventilation used (either the one-lung ventilation technics or the inspired oxygen fraction).

Thus, as study objective of this assay, it was raised the question if the one-lung ventilation could be a factor that would be related to a lung inflammatory response, and if this response might be enhanced by higher than normal oxygen inspired fractions.

Methods

An animal model using New Zeland rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), was created and developed, on which several known triggers for lung inflammation were avoided (controlled ventilation, surgical lung manipulation, medical devices for lung exclusion), in

order to allow validation of experimental results and clinical outcomes.

Our spontaneous one-lung ventilation model was used on two of the three prospective randomized case series, which addressed the questions raised.

At end of procedure rabbit lungs were harvested, and prepared for optical microscopy histological evaluation.

Results

The first serial results showed that one-lung ventilation submitted rabbits had higher inflammatory lung response ($p < 0,05$) when compared to the two-lung ventilation group.

In the second serial study, an odds ratio of 16 (CI 1,8-142,3) was found when a supplemented oxygen group was compared to a room air bipulmonar ventilation group, regarding lung inflammatory response of a moderate grade.

The third serial of results presented a significant difference ($p < 0,001$), between the two one-lung ventilation groups, with a higher frequency of moderate inflammation in the rabbits supplemented with oxygen when compared to the group breathing room air.

Moreover, the lung inflammatory response found in the three series showed a higher number of eosinophils over neutrophils, in a proportion of approximately 75-80% to 20-25%.

Discussion

The fact that the one-lung ventilation includes a total lung atelectasis might explain why these animals had higher lung inflammatory responses, since local hypoxic environment clearly signals and enhances inflammation.

The use of supplementary oxygen might induce formation of small areas of absorption atelectasis, which in turn might be accountable for the generation or augmentation of a lung inflammatory response.

The addition of a known pro-inflammatory factor (lung collapse) with oxygen supplementation was found to be major reason for the appearance of lung inflammation, raising the possibility of a continuation of inflammatory process by both triggers.

The preponderance of eosinophils in the lung inflammatory response, being unexpected, is confirmed by literature, since evidence exists that links these cells to hypoxic acidic environments, namely by the modification of cell function and properties

Conclusions

One-lung ventilation is a relevant factor for the initiation and maintenance of lung inflammatory response with a significant expression.

Oxygen supplementation, in spontaneous ventilation, either bipulmonar or one-lung ventilation, enhances the intensity of lung inflammatory response.

The clinical setting of anesthesia for lung surgery, namely when one-lung ventilation is used, should include strategies that avoid known lung inflammatory triggers, in order to decrease the incidence of postoperative pulmonary complications of an inflammatory kind, such as ALI or ARDS.

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Extenso	Abreviatura	Extenso
ALI	Acute lung injury	MDA	Malondialdeído
ARDS	Acute respiratory distress syndrome	MPM9	Metaloproteinase matricial
CPP	Complicações pulmonares pós-operatórias	NOSG	Grupo sem suplementação de oxigénio
CPAP	Continuous positive airway pressure	OR	Odds ratio
CRF	Capacidade residual funcional	OSG	Grupo com suplementação de oxigénio
DLco	Difusão do monóxido de carbono	PCO ₂	Pressão parcial de dióxido de carbono arterial
FELASA	Federation of european laboratory animal science associations	PEEP	Positive end expiratory pressure
FC	Frequência cardíaca	PO ₂	Pressão parcial de oxigénio arterial
FEV1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo	R	Coeficiente de correlação
FEV1pp	Volume expiratório forçado no primeiro segundo previsto pós-operatória	ROS	Reactive oxygen species
FiO2	Fração inspirada de oxigénio	SpO ₂	Saturação arterial de Oxigénio
FR	Frequência respiratória	TLC	Capacidade pulmonar total
FVC	Capacidade vital forçada	TNF α	Fator de necrose tumoral
HCO3	Nível arterial de bicarbonato	VBP	Ventilação bipulmonar
HIF1	Fator indutor de hipóxia	VILI	Ventilator induced lung injury
IL 6	Interleuquina 6	VMP	Ventilação monopulmonar
IL 8	Interleuquina 8	VPP	Ventilação por pressão positiva
LPA	Lesão pulmonar aguda	VR	Volume residual

Índice de figuras e tabelas

Figura	Descrição	Página
1	Peça T – Mapleson F	60
2	Face ventral diafragma coelho	61
3	Grau de inflamação pulmonar – série 1	82
4	Lâminas série 1 – inflamação ligeira e moderada	84
5	Resultados hemogramas – série 2	92
6	Grau de inflamação pulmonar – série 2	93
7	Lâminas série 2- inflamação ligeira e moderada	94
8	Parâmetros fisiológicos monitorizados	95
9	Resultados de gases de sangue – série 2	99
10	Resultados de gases de sangue – série 3	113
11	Lâminas série 3- inflamação ligeira e moderada	117

Tabela	Descrição	Página
1	Critérios de intensidade de inflamação pulmonar	67
2	Valores de parâmetros monitorizados – série 1	80
3	Mediana de parâmetros monitorizados – série 1	81
4	Resultados de gases de sangue – série 2	98
5	Evolução dos parâmetros fisiológicos – Série 3	109
6	Mediana dos parâmetros fisiológicos –Série 3	110
7	Resultados de gases de sangue – série 3	112
8	Grau de inflamação – série 3	115
9	Resultados globais – Séries 1, 2 e 3	139

Índice

	Título	Página
1	Introdução	25
1.1	A cirurgia e a anestesiologia	25
1.2	A lesão pulmonar aguda (<i>acute lung injury</i>)	27
1.3	A lesão pulmonar associada à ventilação mecânica	32
1.4	Ventilação monopulmonar e inflamação	34
1.5	A atelectasia na ventilação monopulmonar	39
1.6	Complicações pulmonares pós-operatórias	42
1.7	Estratégias protetoras de ventilação controlada	45
1.8	A inflamação associada às variações de aporte de oxigénio	47
2	A investigação – o que se pretende responder	49
2.1	Da prática clínica à investigação	49
2.2	As perguntas formuladas	53
3	Materiais e métodos	54
3.1	Os animais	57
3.2	Instrumentação	58
3.3	Monitorização	63
3.4	Histologia	65
3.5	Análise estatística	67
3.6	Metodologia de divisão das séries de estudo	69
3.6.1	Série 1 – pergunta 1	70
3.6.2	Série 2 – pergunta 2	72

3.6.3	Série 3 – pergunta 3	74
4	Resultados	76
4.1	Séries de estudo	76
4.2	Resultados obtidos	77
4.2.1	Série 1	77
4.2.2	Publicação de resultados da série 1	84
4.2.3	Série 2	90
4.2.4	Publicação de resultados da série 2	99
4.2.5	Série 3	107
4.2.6	Manuscrito aceite para publicação com resultados da série 3	117
4.2.7	Resultados globais	138
5	Discussão	139
5.1	Série 1	139
5.2	Série 2	144
5.3	Série 3	148
5.4	Discussão geral	154
5.4.1	Breve revisão da anestesia para cirurgia pulmonar	154
5.4.2	Os resultados desta investigação e a anestesia para cirurgia pulmonar	165
5.4.3	Limitações dos trabalhos de investigação desta dissertação	167
6	Conclusões	169
7	Considerações finais	171
8	Bibliografia	174

1 Introdução

1.1 A cirurgia e a anestesiologia

A ciência médica tem-se pautado pela crescente complexidade de atos terapêuticos que, na sua vertente cirúrgica, inclui procedimentos de risco e/ou complexidade cada vez mais elevados, em doentes com um número também crescente de co-morbilidades.

A cirurgia torácica, e a pulmonar em particular, não constituem exceção; o progresso das suas técnicas cirúrgicas tem permitido avançar com sucesso no tratamento de doentes com situações clínicas cada vez mais complexas. A anestesiologia tem contribuído de sobremaneira para que novos métodos cirúrgicos mais invasivos sejam possíveis.

Um dos desafios da anestesia na cirurgia pulmonar é o tipo de ventilação dos doentes durante o ato cirúrgico. A necessidade de disponibilizar à equipa cirúrgica um campo operatório com espaço que permita a sua ação, torna imprescindível a ventilação monopulmonar (VMP), em que é inerente a exclusão de um dos pulmões da atividade respiratória do doente [1]. A VMP é um desafio, tanto pelos seus riscos imediatos como pelas eventuais consequências para o doente as quais poderão ocorrer tardiamente.

É de lembrar que a ventilação artificial, mesmo que de ambos os pulmões, é sempre fisiologicamente estranha ao corpo humano. A fisiologia respiratória humana não está preparada para suportar uma

inversão daquilo para que foi desenhada: o homem ventila por gradientes de pressão e não por pressão positiva. Só este facto, torna a ventilação mecânica por pressão positiva uma “quase” aberração fisiológica.

Para obviar este problema fundamental, foram desenvolvidas metodologias menos agressivas de ventilação mecânica, com um especial cariz protetor para o tecido pulmonar [2][3]. Naturalmente, estes problemas são mais acentuados na VMP, adquirindo o único pulmão que se mantém a ventilar durante a cirurgia a designação de *baby-lung* [4][5][6], dada a sua inegável fragilidade quando a VMP tem que ser aplicada.

1.2 A lesão pulmonar aguda (*acute lung injury*)

A ventilação artificial por pressão positiva (VPP) assegura a oxigenação mas pode causar lesão pulmonar. Esta, quando preenchidos determinados critérios de diagnóstico clínico (início agudo, quociente da pressão parcial de oxigénio arterial/ fracção inspirada de oxigénio - $PaO_2 / FiO_2 < 300$ mmHg, infiltrados bilaterais na imagem radiológica torácica frontal e pressão da encravamento da artéria pulmonar < 18 mmHg) denomina-se como lesão pulmonar aguda (LPA) (*acute lung injury* - ALI) [7]. Neste tipo de lesão, os macrófagos alveolares são a fonte principal de produção de mediadores inflamatórios (fator de necrose tumoral alfa - $TNF \alpha$; interleuquinas 6 e 8 - IL6 e IL8; metaloproteinase matricial - MPM9) [8]. Uma intensa distensão alveolar supra fisiológica, por vezes produzida pela VPP, pode prolongar a LPA [9].

A LPA resultante de determinados procedimentos cirúrgicos torácicos (por exemplo, esofagectomia) é semelhante à encontrada em doentes com síndrome de stress respiratório agudo (ARDS). Caracteriza-se pelo aumento da concentração de proteínas nos fluídos de lavados alveolares, pelo aumento da permeabilidade capilar pulmonar, e pela produção de mediadores inflamatórios [10]. A necessidade de oxigenação em certos tipos de cirurgias torácicas, leva a que se utilizem frações inspiradas de oxigénio particularmente elevadas, não raras vezes de 100%. A utilização de oxigénio é por si só um fator agravante da lesão pulmonar e, no caso da VMP, de lesão em

ambos os pulmões. O mecanismo subjacente a esta toxicidade do oxigénio puro está ligado ao aparecimento de substâncias oxidantes (radicais livres), que resultam da quantidade supra fisiológica de oxigénio que é usada. Denominam-se internacionalmente estas moléculas como *reactive oxygen species* (ROS) as quais têm a capacidade de danificar proteínas, lípidos e ácidos nucleicos dos tecidos do doente [10].

Após procedimentos cirúrgicos torácicos complexos, existe probabilidade aumentada de ocorrência de LPA, como por exemplo nas esofagectomias em que se procede a uma toracotomia eletiva e VMP, com cerca de 10% destes doentes a serem acometidos de LPA pós-operatória. A fisiopatologia da LPA nesta situação parece ser semelhante à que se observa no trauma ou na sepsis, ou seja de um síndrome inflamatório sistémico [10].

O pós-operatório, em especial nas intervenções cirúrgicas pulmonares, é sempre merecedor de preocupação, existindo inclusive entidades nosológicas específicas que assim o atestam como, por exemplo, o edema pulmonar pós-pneumectomia. Neste caso concreto, a histologia do tecido pulmonar remanescente é em tudo idêntica à encontrada nos pulmões do ARDS, ou seja, revela a forma mais grave de LPA ou ALI [7].

Durante as cirurgias ao pulmão realçam-se alguns eventos que, em conjunto, podem estar relacionados com o aparecimento da ALI, nomeadamente: 1) a *fluidoterapia* que constitui um fator de risco (se

for superior a dois litros durante toda a intervenção); 2) a *disrupção da normal drenagem linfática*; 3) o *grau de manipulação cirúrgica* (dada a estrutura delicada do pulmão, algum grau de lesão parenquimatosa semelhante à contusão pulmonar está associada sempre à manipulação, o que pode induzir uma reação inflamatória relevante); e 4) a *VMP no pulmão remanescente* que, eventualmente sujeito a ações necessárias mas algo agressivas (como por exemplo: a) hiperóxia decorrente de utilização de frações inspiradas de oxigénio supranormais para colmatar eventos hipóxicos intraoperatórios, b) volutrauma e c) hiperinsuflação), poderá afetar esse pulmão por uma importante reação inflamatória [7].

Nos casos de suplementação com oxigénio supra fisiológico, os polimorfonucleares neutrófilos têm sido implicados como a fonte mais importante de ROS afetando o tecido pulmonar. No entanto, existem estudos experimentais [7] que mostram que roedores depletados dos seus neutrófilos, também apresentam lesão pulmonar mediada pelos mesmos mecanismos, dando a impressão que, pelo menos em estudos animais, os neutrófilos poderão não ser os primeiros responsáveis pelo processo de LPA, pelo menos num estadio muito precoce deste tipo de lesão [7].

A LPA, apesar de ser pouco frequente na generalidade dos períodos pós-operatórios, quando se manifesta, pode estar associada a mortalidades entre os 10 e os 20% dos doentes sujeitos a cirurgia

pulmonar, refletindo um espectro variado de lesões com ativação de vários tipos de linhas celulares, libertação de citocinas e de ROS [11].

A ligação entre a LPA e as características da ventilação controlada, é um conceito que tem vindo a ganhar robustez científica. A LPA e o ARDS pós pneumectomia, associam-se a volumes correntes elevados e a altas pressões durante VMP. Também durante a ventilação bipulmonar (VBP) se mostrou que uma abordagem com volumes correntes superiores a 8 ml/kg é deletéria para os pulmões [12].

O stress oxidativo e o aumento de citocinas pró-inflamatórias podem contribuir significativamente para a ocorrência da lesão pulmonar pós-cirurgia, que também se pode associar ao processo de isquemia-reperfusão decorrente da exclusão pulmonar, em casos de ressecção pulmonar parcial. Existem fatores de risco identificados para esta situação, nomeadamente: a pneumectomia direita, o excesso de fluidos, as alterações de drenagem linfática, a oxigenoterapia supranormal, a disfunção ventricular direita, as pressões ventilatórias intraoperatórias elevadas e o alcoolismo crónico [13].

O malondialdeído (MDA) é um marcador plasmático de formação de ROS em doentes submetidos a ressecções pulmonares. Há evidência de que a VMP e a sua duração são fatores relevantes para a ocorrência de stress oxidativo, sendo que o denominado índice de hiperpressão (produto entre a pressão de *plateau* média intraoperatória superior a 10 cmH₂O e a duração da VMP) é um fator de risco independente para

a LPA. Daí a utilização preventiva de baixos volumes correntes (inferiores a 8 ml/kg de peso ideal [14]), a aceitação de uma hipercapnia permissiva e possivelmente de uma saturação arterial com oxigénio para valores no extremo inferior do normal [13].

A hipoxemia continua a ser o principal problema clínico durante a VMP, que *per si*, pode causar lesão pulmonar. Tanto a VMP como o ALI/ARDS se refere a um pulmão de pequeno volume (*baby-lung*), o que justifica que a magnitude da hipoxemia durante a VMP se relacione com a existência de atelectasias e o desequilíbrio entre a ventilação e perfusão pulmonares.

A hiperinsuflação, usada por vezes para tratar este problema, aumenta a ocorrência de resposta inflamatória aguda de grande magnitude (ALI) no pós-operatório do doente [5]. Deste modo, recomenda-se o uso sistemático de ventilação por controlo de pressão, baixos volumes correntes, pressão positiva no final da expiração (PEEP), manobras de recrutamento no pulmão a ser ventilado e, caso necessário, pressão positiva contínua na via aérea (CPAP) no pulmão a ser intervencionado cirurgicamente, com uma abordagem atenta à fracção inspirada de oxigénio, uma vez que o oxigénio tem potenciais consequências lesivas para o pulmão, como o são a formação de atelectasias de absorção após a sua utilização, mesmo após a pré-oxigenação [5].

1.3 Lesão pulmonar associada à ventilação mecânica

A lesão pulmonar associada ao ventilador (*ventilator associated lung injury* - VALI) é definida como uma lesão semelhante ao ARDS e que pode ocorrer em doentes sujeitos a ventilação mecânica. Em modelos animais, a lesão pulmonar induzida pelo ventilador foi bem documentada e é definida como uma lesão pulmonar diretamente causada pela ventilação mecânica (*ventilator induced lung injury* - VILI) [15].

Existem vários tipos de reações pró-inflamatórias e pró-fibrogenéticas que podem estar envolvidas na VILI. Por exemplo, a ventilação mecânica cursando com altas pressões pode causar ativação de respostas celulares mediadas por neutrófilos, que contribuem para um estado inflamatório pulmonar que estará na gênese da VILI [16] [17].

A VILI causada pela ventilação com pressão positiva pode ser acentuada pela hiperóxia e pelo uso de grandes volumes correntes que, numa primeira instância, causam edema pulmonar de etiologia não cardiogénica (ARDS), com infiltração leucocitária e aumento da permeabilidade vascular. Contudo, se apenas a pressão aumentar mas o volume alveolar for mantido em valores fisiologicamente aceitáveis, poderá ser evitado o aparecimento de edema pulmonar, o que faz pensar numa etiologia mais ligada ao volutrauma do que ao barotrauma [18] [19]. Pulmões saudáveis antes da ventilação assistida podem ser acometidos de uma VILI, sendo que estão definidas

estratégias protetoras na redução de VILI, tanto para doentes com ARDS [20] [21], como para indivíduos saudáveis [22].

O edema pulmonar observado na VILI aparece sempre que um volume expiratório final é elevado, seja por volume corrente alto ou por excesso de PEEP. A resposta celular ao estiramento mecânico do pulmão tem sido estudada, tanto do lado do epitélio como do lado do endotélio, sendo a presença de edema não hidrostático uma constante. É de referir que a ventilação com pressão negativa em animais, usando o *iron-lung*, não demonstrou ser precursora de edema pulmonar, ficando a noção de volutrauma mais próxima da realidade, uma vez que estudos em várias espécies de mamíferos (ex: rato e coelho) mostraram que os baixos volumes não induzem lesão pulmonar e, por outro lado, a lesão pulmonar pode surgir em situações de baixa pressão das vias aéreas [19] [23].

É relevante mencionar que abdicar de PEEP poderá não ser indicada na prevenção da VILI, uma vez que o seu uso previne a ocorrência de um potencial desequilíbrio na distribuição da ventilação pelo pulmão que, por si só, poderá estar ligada ao excesso de volume (ventilação) de algumas zonas do pulmão (volutrauma) [24], criando assim a possibilidade da ocorrência de VILI regional [19].

A continua distensão mecânica do epitélio alveolar contribui para uma resposta inflamatória sistémica, para a redução da sobrevivência das células alveolares tipo II e para o desequilíbrio entre mediadores pro e anti-inflamatórios [25].

1.4 Ventilação monopulmonar (VMP) e inflamação

Apesar de amplamente descritas as consequências fisiológicas da VMP, como por exemplo o *shunt* que se forma, ou a vasoconstrição pulmonar hipóxica que surge, praticamente não existem relatos explícitos de eventuais alterações histológicas causadas pela VMP [26]. Existe referência a lesão vascular com a re-insuflação após exclusão de um dos pulmões, com a respetiva congestão, assim como o aumento de peso do pulmão após ventilação com volumes correntes elevados, indicando edema pulmonar [27].

Sendo a hipóxia um dos problemas clínicos mais frequentes durante a VMP, pelas consequências clínicas e como fator iniciador de inflamação aguda [28], é relevante que a fracção inspirada de oxigénio a utilizar seja a menor possível (mas que garanta uma oxigenação efetiva), uma vez que só dessa forma se poderá minimizar o potencial de lesão oxidativa. Sabe-se que os ROS que se formam durante a VMP têm a capacidade de prolongar a resposta inflamatória pulmonar [29].

A hipóxia como fator pró-inflamatório que pode aparecer na sequência da VMP traduz-se pelas características que definem inflamação aguda, ou seja, um processo de resposta rápida por parte de um órgão ou organismo que coloca leucócitos e proteínas no local da lesão [28].

A intensidade da resposta inflamatória após VMP pode estar relacionada com o tempo de exclusão pulmonar, com o grau de ressecção pulmonar e também com a extensão da manipulação

mecânica do órgão durante o ato cirúrgico; ou seja, quanto maior for o tempo de VMP e o grau de ressecção pulmonar, maior será a resposta inflamatória e a lesão oxidativa do pulmão [30].

Um excessivo volume corrente e o “stress” mecânico podem criar uma primeira lesão (*primary-hit*), ou uma lesão secundária (*secondary-hit*) num doente suscetível, levando à recomendação de estratégias protetoras de ventilação, que possam reduzir a inflamação e a ALI, as quais também são válidas para a VMP [29].

O índice de hiperpressão (produto da pressão plateau inspiratória e do tempo de VMP) [11] também ilustra a potencial participação do tempo de VMP no aparecimento de ALI. Apesar de anteriormente se ter referido a possibilidade do volume ser provavelmente mais influente para o aparecimento de ALI, a pressão em VMP não pode ser descartada como etiologicamente irrelevante [29].

Em cirurgia pulmonar, com a necessidade de uso de VMP, devem ser usadas estratégias protetoras do pulmão [27]. O uso de PEEP pode ser controverso dada a pressão gerada por esta manobra, designadamente no único pulmão que se mantém ventilado. Assim, o uso protetor de volumes correntes baixos deve incluir também PEEP, porque há que evitar o colapso alveolar, sendo que a auto-PEEP não é fidedigna do arejamento pulmonar [31], devendo a noção de *best-PEEP* (entre 5 e 10 cm H₂O) ser, a este propósito, levada em consideração [32].

Sendo a LPA ou ALI expressões inflamatórias pós-operatórias do que se passa no intraoperatório [33][34], fica claro que estas estratégias protetoras intraoperatórias serão uma forma de minimizar estas consequências indesejáveis.

Durante a VMP, que pressupõe a criação de uma atelectasia total do pulmão a ser intervencionado, deve evitar-se que o mesmo fenómeno ocorra no pulmão que se mantém ventilado. No fundo, trata-se de minimizar o risco do que sabemos que poderá vir a acontecer.

Existem recomendações para que se seja mais amplo em termos de quantidade de volume corrente para manter o arejamento pulmonar [33]. Vários autores defendem que volumes correntes de 10 ml/kg serão necessários para minimizar a ocorrência de shunt e manter a ventilação alveolar, assumindo também que tal prática tem claras consequências inflamatórias, evidenciadas pelo aumento de marcadores, como $TNF\alpha$, IL-8 e elastase de polimorfonucleares, tanto do pulmão ventilado como do pulmão excluído ou atelectasiado [33][35].

A VMP pode alterar a histologia do pulmão, particularmente porque existe insuflação após a atelectasia. A lesão vascular depois da VMP tem uma importância especialmente relevante, uma vez que, durante a VMP existe resposta fisiológica de vasoconstrição pulmonar hipóxica (para diminuir *shunt* decorrente da VMP), acompanhada por

lesão endotelial, congestão vascular e diminuição da produção de óxido nítrico [26].

A resposta inflamatória após VMP diminuí quando são usados anti-inflamatórios potentes, como por exemplo a metilprednisolona, antes da exclusão pulmonar. Este fármaco não só reduz a resposta inflamatória, como também parece melhorar a função pulmonar em geral [36][37].

O doseamento de mediadores inflamatórios pode ser útil para avaliar o grau de lesão que estará em curso. É de notar que, existindo uma subida nos mediadores inflamatórios, pode ocorrer que os seus contrários (mediadores anti-inflamatórios) também surjam elevados [38], sabendo-se inclusivé que alguns destes mediadores têm valor de prognóstico [39]. É de referir que em ambiente peri-operatório, existe evidência de algum efeito protetor/modulador de alguns anestésicos gerais em VMP, como por exemplo, o sevoflurano [40][41].

O papel do oxigénio na VMP deve ser entendido globalmente. Na atelectasia de um pulmão na VMP, induz-se o aparecimento de hipóxia local e de um ambiente ácido, decorrente do aparecimento do já referido *shunt* (áreas de perfusão sem ventilação).

A hipóxia e a inflamação caminham lado a lado e partilham uma relação interdependente, uma vez que a hipóxia pode gerar inflamação e vice-versa [42].

A utilização de oxigénio supranormal em VMP também tem sido associada a lesão do tecido pulmonar [43], tanto no pulmão ventilado como no pulmão excluído, lesão esta que aumenta com o tempo de exposição ao oxigénio [44]. O denominado stress oxidativo está na génese da lesão celular encontrada [7]. Existe uma relação clara entre hiperóxia e migração de polimorfonucleares para os alvéolos [18], sendo que ao potencial volutrauma associado a este facto (e no final da cirurgia pulmonar, a lesão de reperfusão) se adicionarão também os seus efeitos deletérios.

Vários estudos têm constatado que existe atingimento inflamatório pulmonar bilateral quando é utilizada VMP. Contudo, em termos de lateralidade, parece haver uma preponderância de inflamação no lado excluído ou colapsado (atelectasiado) quando comparado com o pulmão ventilado [44].

1.5 Atelectasia na ventilação monopulmonar

As atelectasias por compressão ocorrem quando diminui a pressão transmural que mantém o alvéolo aberto [45]. As atelectasias de absorção surgem quando são menos os gases que chegam aos alvéolos do que aqueles que são removidos pela corrente sanguínea alveolar, ou quando um determinado gás é particularmente solúvel no sangue (oxigénio). A perda de surfactante também condiciona a formação de atelectasias porque induz um aumento da tensão superficial do alvéolo [45].

São fatores que influenciam a formação de atelectasias a utilização de altas fracções de oxigénio inspirado e a existência de uma menor capacidade residual funcional (CRF) (soma entre volume de reserva expiratório e volume residual), como sucede, por exemplo, nos doentes com obesidade mórbida [45].

Quase todos os anestésicos (exceto a quetamina) diminuem o tônus muscular e, portanto, o tônus estático do pulmão a que se soma, em termos volumétricos, a diminuição da CRF em cerca de 100 ml só com o decúbito dorsal e em cerca de 400 a 500 ml com a anestesia geral [46]. Nesta gama de volumes pulmonares, as pequenas vias aéreas fecham durante a expiração com a subsequente ocorrência de *shunt* (baixo quociente ventilação/perfusão - V/Q).

Se antes da administração de anestésicos se proceder a uma administração oxigénio a 100% (denominada pré-oxigenação) irão formar-se zonas de atelectasia, uma vez que o oxigénio, sendo muito

solúvel no sangue, irá ser absorvido pela corrente sanguínea, ou seja, após esta absorção o sustentáculo gasoso dos alvéolos desapareceria, formando-se então a atelectasia. Quando são utilizadas frações inspiradas de oxigénio inferiores a 100%, existe uma componente de azoto na mistura de gases com origem no ar ambiente que, não sendo absorvido pela corrente sanguínea, mantém os alvéolos “abertos”, sendo o chamado CPAP natural, evitando deste modo o colapso alveolar e a formação de atelectasias [46].

É manifestamente importante tomar medidas para prevenir a formação de atelectasias, que podem prevalecer no pós-operatório imediato, designadamente através de utilização de fracções inspiradas de oxigénio inferiores a 100% (recomendavelmente entre 75-80%), que assegurem alguma reserva para eventual situação de dificuldade de intubação e potencial hipoxémia que possa vir a surgir [47].

As estratégias de prevenção de atelectasias devem considerar que, grandes volumes correntes, níveis excessivos de PEEP e pressões altas de ventilação se associam a uma maior percentagem de complicações pulmonares pós-operatórias (CPP), inflamação pulmonar e VILI, sendo que um dos mecanismos pelo qual as atelectasias induzem lesão pulmonar será decorrente da hipóxia local e subsequente inflamação nessas áreas [48].

As atelectasias podem exercer um efeito cumulativo nas CPP, sendo que estas e a instabilidade alveolar predispõem claramente para a ALI seguindo os seguintes mecanismos: o recrutamento alveolar, a

abertura e fecho cíclicos dos alvéolos (no limite entre o colapso e o arejamento alveolar) e o stress repetitivo de cisalhamento que destrói as estruturas celulares, associados à sobredistensão de unidades pulmonares não atelectasiadas [48].

1.6 Complicações pulmonares pós-operatórias (CPP)

As CPP podem surgir após vários tipos de cirurgia torácica. A frequência com que ocorrem depende do tipo de cirurgia, do estado clínico do doente no pré-operatório, nomeadamente da sua função pulmonar prévia do doente [10], da duração dos períodos de hipoxemia intraoperatória, do envolvimento linfático na técnica cirúrgica, da quantidade de fluidos administrados e do tipo de ventilação usada [49], existindo séries que reportam incidências de 50% de CPP após cirurgia torácica [10].

Das variadas CPP, já foi referenciada a *lesão pulmonar aguda*, associada ou não ao uso de ventilação controlada, a *inflamação pulmonar associada à VMP*, pelo facto de mantermos um dos pulmões atelectasiados durante a cirurgia, existindo ainda uma entidade nosológica que merece ser referida pela sua frequência e/ou gravidade, e que se denomina como *lesão associada à re-expansão pulmonar*.

A re-expansão de um pulmão, que esteve atelectasiado durante algum tempo e que foi cirurgicamente manipulado, traduz-se por alterações da permeabilidade microvascular que poderá conduzir a edema pulmonar que, pela sua influência nas trocas gasosas, poderá comprometer o tratamento do doente [50].

O aumento de marcadores inflamatórios como a Interleuquina 8 (IL-8), a razão entre pulmão seco/molhado, e os dados do lavado

bronco-alveolar permitem identificar ocorrência desta lesão, que tem uma forte componente inflamatória [50].

A lesão encontrada após a expansão pulmonar na sequência de uma exclusão unilateral, tem sido observada em ambos os pulmões, estando associada a um aumento de marcadores inflamatórios que, pode ter um prognóstico fatal em cerca de 20% dos doentes [51], e por isso se deverá assumir como sistêmica.

Apesar do edema de re-expansão pulmonar estar amplamente descrito em situações de colapso pulmonar crónico, a sua evidência após um curto espaço de tempo (1 a 2 horas), que corresponderá a uma cirurgia torácica não complicada, é menos conhecida. O aparecimento de infiltrado celular inflamatório agudo pode dever-se mais à manipulação cirúrgica e subsequente perfusão do pulmão, do que à própria exclusão e re-expansão pulmonares [52].

A clínica apresentada pelos doentes acometidos desta complicação pós-operatória manifesta-se precocemente, com as primeiras manifestações logo às 6 horas, mesmo em doentes sem disfunção cardíaca prévia [49].

As lesões encontradas são por vezes indistinguíveis, mesmo histologicamente, de um ARDS e podem traduzir uma lesão endotelial global, decorrente de um processo inflamatório induzido pela intervenção cirúrgica, envolvendo o colapso e a re-expansão pulmonar [7].

Apesar do risco, e da necessidade do respetivo controlo nas primeiras 24 horas de pós-operatório, é de lembrar que a falência respiratória pode estar também associada aos efeitos laterais dos opióides usados no controlo da dor, sendo que a hipóxia é o fator mais determinante de desfecho desfavorável até ao terceiro dia de pós-operatório da cirurgia pulmonar [53].

1.7 Estratégias protetoras de ventilação controlada

O volume corrente que for selecionado para a ventilação controlada é determinante para a ocorrência de lesão pulmonar. Deve aproximar-se de volumes fisiológicos, ou seja da ordem dos 6 ml/kg de peso ideal [54]. A utilização de volumes correntes da ordem dos 10 ml/kg de peso ideal levam ao aparecimento de marcadores de atelectotrauma, como é o aumento da elastase dos polimorfonucleares neutrófilos e de volutrauma (distensão alveolar exagerada), com um aumento da proteína 16 das células *Clara* [55].

Mesmo ao nível dos indicadores de resultado, como por exemplo as taxas de sobrevivência, os baixos volumes correntes aparecem sempre como favoráveis [34] [2].

O uso de PEEP para contrabalançar estes baixos volumes além do necessário [27], é comumente aceite para o recrutamento pulmonar, que sabemos ter a tendência natural ao colapso [2].

É hoje possível saber que o uso de baixos volumes correntes se associa a melhores resultados e a menores consumos de recursos de saúde [56], tratando-se, no fundo, de reconhecer uma causalidade que se suspeitava.

As estratégias de ventilação protetora implicam a utilização de volumes correntes menores, mais perto dos fisiológicos, sendo que esta prática conduz a uma menor quantidade de mediadores e sinalizadores inflamatórios, melhor manutenção do equilíbrio

ventilatório e respectivas trocas gasosas, menor quantidade de edema pulmonar ou seja de fluido pulmonar extravascular, menor número de complicações e por consequência melhores resultados clínicos [3] [57] [58].

1.8 A inflamação associada às variações de aporte de oxigénio

A inflamação aguda está associada a défice de energia e a baixa oxigenação, ou seja, a hipóxia tecidular induz inflamação e acidose metabólica, com recrutamento de células inflamatórias, nomeadamente da série mieloide [59].

Na inflamação local, os eosinófilos têm a possibilidade de migrar por diapedese dos capilares para o compartimento extravascular. A diapedese envolve ativação celular que permite a travessia da parede capilar pelos eosinófilos, sem que haja desgranulação ou libertação de oxidantes [60].

Os eosinófilos estão envolvidos em numerosos processos inflamatórios, por exemplo em resposta a infeções parasitárias [61]. Os eosinófilos respondem especialmente à hipóxia, que lhes aumenta a viabilidade e inibe a apoptose, prolongando o tempo de vida [62].

O ambiente tecidular hipóxico apresenta concentrações aumentadas de lactato e de metabolitos redutores, alterando as propriedades das células da série mieloide, com o fator indutor de hipóxia (HIF1) funcionando como o maior regulador destes mecanismos [62].

Na VMP, há ambiente hipóxico e de baixo pH decorrente da atelectasia total do pulmão ou seja exclusão pulmonar. A hipóxia regional que se sucede à formação de atelectasias de absorção, decorre do facto da solubilidade do oxigénio no sangue permitir que

este saia dos alvéolos. Com a absorção do oxigénio, existe um colapso alveolar e são criadas regiões de shunt, ou seja, zonas de perfusão sem ventilação. O uso de oxigénio externo podendo causar a formação de atelectasias de absorção e subsequentemente áreas de *shunt*, conduz ao aparecimento inflamação local.

A ventilação monopulmonar, adicionada à utilização de oxigénio supra fisiológico, poderá assim favorecer inflamação que poderá evoluir para uma lesão pulmonar aguda (LPA ou ALI), ou para algo mais grave, como o ARDS.

Assim, na sequência da VMP, a ventilação ideal será a ventilação espontânea, já que a ventilação controlada que é potencialmente deletéria e pró-inflamatória, e idealmente sem o recurso a suplementos de oxigénio e também com o mínimo de manipulação cirúrgica do pulmão a ser operado.

2 A investigação – o que se pretende responder

2.1 Da prática clínica à investigação

Existe na área da anestesia para cirurgia torácica em geral e para cirurgia pulmonar em particular, um fator de incerteza apreciável.

A imprevisibilidade de ocorrência de CPP após cirurgia torácica, afigurou-se-me como a questão importante que justifica a procura das suas causas. A experiência pessoal do autor têm-lhe revelado que, existindo uma metodologia anestésica e cirúrgica sistematicamente semelhante, praticada pelos mesmo profissionais, em doentes que se apresentam essencialmente como idênticos em termos de idade, comorbilidades e cirurgia realizada, merece ser investigada a razão da ocorrência de situações de insuficiência respiratória pós-operatória em alguns destes doentes sujeitos a cirurgia torácica.

No início do presente estudo resolvemos investigar quais as consequências da ventilação monopulmonar usada durante a cirurgia torácica, tendo em conta a sua contribuição para complicações pós-operatórias, a que se junta a contribuição da ventilação mecânica, da formação de atelectasias e da oxigenoterapia supra fisiológica.

A prática clínica do autor desta dissertação inclui a anestesia para cirurgia torácica, lidando com doentes com variadas morbilidades, sendo necessário responder aos desafios dos pós-operatórios inerentes aos diversos tipos de cirurgia.

A constante preocupação em otimizar a situação clínica dos doentes no pré-operatório, no sentido de minimizar a possibilidade de ocorrência de eventos indesejados, junta-se o desafio levantado por abordagens cirúrgicas cada vez mais complexas e exigentes.

É sempre pertinente lembrar a grande prevalência de patologia associada da área cardiovascular e respiratória na população cirúrgica sujeita a cirurgia torácica. É mandatório que os doentes propostos para resseção de tecido pulmonar tenham um estudo pré-operatório que inclua a quantificação da função mecânica pulmonar, função parenquimatosa e reserva cardiopulmonar [1].

Um dos maiores desafios, neste tipo de doentes e neste tipo de cirurgia, é a autonomização do doente em termos de ventilação após a cirurgia, ou seja, todas as intervenções médicas que contribuam para uma maior reserva respiratória e bem-estar, por exemplo analgesia adequada, contribuem para esta autonomização e, portanto, para uma extubação precoce e retorno à ventilação espontânea, logo no final da cirurgia.

A ocorrência de CPP tem diminuído significativamente fruto da evolução técnica e da melhor preparação dos doentes. No entanto, a cirurgia torácica por si só, e a ventilação monopulmonar inerente, são um fator de risco conhecido para a ocorrência de CPP.

Mesmo com a utilização dos recursos técnicos à disposição, será sempre possível ser surpreendido por um desfecho não desejado no pós-operatório de um doente submetido este tipo de cirurgia,

especialmente se a magnitude da manipulação pulmonar for apreciável, o tempo de intervenção for longo, as quantidades de oxigénio usadas forem muito altas, a técnica de ventilação não for suficientemente protetora do pulmão que fica a ventilar durante a cirurgia, e a fluidoterapia empregue não for aquela que se pensa ser a necessária.

Alguns dos doentes sujeitos a cirurgia torácica podem vir a apresentar uma insuficiência respiratória, em que a relação entre a pressão parcial de oxigénio arterial (PaO_2) e a fracção inspirada de oxigénio (FiO_2) está diminuída [7]. Esta fraca oxigenação traduz a definição de um processo inflamatório, inicialmente denominado ALI ou LPA que, em certos doentes, evolui favoravelmente e noutros se agrava para a situação mais grave de todas, o ARDS.

A evolução dos conhecimentos veio a considerar que este espectro de patologia era mais uma evolução de uma doença única, tendo passado a ser denominado, desde a última conferência de consenso como ARDS ligeiro, moderado ou grave, conforme a gravidade da diminuição da relação PaO_2/FiO_2 [63] [64].

As estratégias cirúrgicas, nomeadamente o tipo de cirurgia proposta, a metodologia cirúrgica (toracotomia ou toracosopia), ou seja, a forma como será manipulado o pulmão no intraoperatório e o tempo que acarretará de exclusão pulmonar, certamente terão consequências no resultado final da função respiratória do doente.

Há que inventariar as implicações anestésicas na equação geral da intervenção cirúrgica ao tórax. O tipo de ventilação usada, que sabemos ter um importância clara nas consequências inflamatórias pulmonares que dela decorrem, a quantidade de oxigénio utilizada e as metodologias empregues no tratamento dos episódios de hipóxia sistémica intraoperatória, ou mesmo a complexidade com que a ventilação monopulmonar foi levada a efeito, poderão individualmente ou em conjunto ter influência no pulmão do doente que entregamos no recobro.

Esta preocupação advém do facto de se saber que a inflamação pulmonar, que possa advir de uma intervenção cirúrgica, pode ser o fator que despoleta de uma lesão pulmonar aguda (LPA ou ALI) que, por sua vez, em certas condições, poderá evoluir desfavoravelmente para uma situação de elevada mortalidade como o ARDS.

Tendo em consideração o anteriormente mencionado, adoptou-se um modelo animal que permitisse obter respostas às perguntas formuladas, com vista ao esclarecimento do papel da ventilação monopulmonar e do oxigénio nas lesões pós-operatórias do pulmão.

2.2 As perguntas formuladas

1. A circunstância de se ventilar apenas um pulmão, excluindo o outro pulmão da ventilação fisiológica bilateral, através da formação de uma atelectasia total, será em si um fator de resposta inflamatória pulmonar?

2. O oxigénio pode despoletar inflamação pulmonar em animais sujeitos a ventilação espontânea?

3. Se a VMP, em modelo de ventilação espontânea, for confirmada como um fator que despoleta inflamação pulmonar, esta poderá ser agravada pela utilização de oxigénio?

Respostas a estas questões foram procuradas utilizando um modelo experimental no coelho que foi escolhido para o efeito.

3 Materiais e Métodos

Não se pretende dizer que não seria possível estudar inflamação pulmonar em humanos, mas, metodologicamente, clinicamente e eticamente não seria possível manter as mesmas características das investigações aqui relatadas, num modelo humano. Não se trata apenas do facto de se realizar a colheita total dos pulmões no final do procedimento, mas também a circunstância de se ter criado um modelo de VMP em ventilação espontânea o que, como é sabido, é clinicamente muito complexo no homem, com eventuais consequências clínicas incomportáveis para um projeto de investigação.

Assim, e tendo-se optado pelo modelo animal, foi necessário escolher o animal mais adequado. Foram aqui ponderadas questões anatómicas, metodológicas e logísticas.

A escolha da espécie teria de prever a possibilidade de isolar um pulmão, podendo este ser deixado a ventilar, e excluir o outro deste processo ventilatório, pelo que, teria de ser uma espécie que inequivocamente possuísse separação pleural mediastínica (algo que está ausente em algumas espécies de mamíferos).

Por outro lado, foi primariamente decidido que não se utilizaria ventilação controlada, pela inerente contribuição para o processo inflamatório pulmonar em si. O animal a ser escolhido teria também que ser logisticamente viável, não só em termos de fornecimento por parte de um criador credenciado, como também o seu transporte até

ao laboratório teria de ser exequível, as condições de habitabilidade em biotério compagináveis com as instalações disponíveis, e a sua possibilidade de manutenção e conforto teriam de ser praticáveis.

Tendo em conta as características atrás mencionadas, optou-se pelo coelho New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*). Trata-se de uma espécie com produtores credenciados conhecidos, com possibilidade de transporte seguro e exequível até ao laboratório e que poderia ser acolhida com conforto e reprodutibilidade nas instalações disponíveis.

Escolhida a espécie, e fruto da formação encetada pelo signatário da presente dissertação na área de ciência de animais de laboratório (FELASA – nível C), associada aos conhecimentos dos colaboradores do laboratório onde se desenvolveu o estudo, foi possível garantir as condições essenciais ao bem-estar animal durante a sua estadia no Departamento de Anatomia Normal do ICBAS.

No âmbito geral do modelo construído, foram sistematicamente evitados os fatores de eventual variabilidade individual dos animais, como sejam: as influências externas que podem incluir o tipo de instrumentação executada, as diferenças de relacionamento com a monitorização e de resposta aos fármacos e a eventual variabilidade da diferente resposta ao stress cirúrgico.

A metodologia utilizada, para assegurar reprodutibilidade experimental, incluiu a sistemática utilização do mesmo tipo de material, a execução técnica dos vários passos da experiência sempre

pelos mesmos profissionais e o cumprimento metódico das várias rotinas experimentais.

3.1 Animais

A logística organizada para fazer face às questões de alojamento do animais, incluiu a sua recepção (coelhos New Zeland - *Oryctolagus cuniculus*), o seu acondicionamento nas respetivas gaiolas (individuais) e a instituição de alimentação e hidratação sem restrições, assim como condições de conforto (incluindo objetos adequados a atividades que proporcionassem ao animal o necessário relaxamento e um ambiente calmo, como por exemplo caixas ou rolos de cartão).

Em todos os animais foi garantida uma semana de quarentena, nas condições atrás mencionadas, ao que se adicionou a visita diária, pelo menos duas vezes por dia, dos colaboradores e/ou investigadores, a administração de antibioterapia profilática standard (enrofloxacina, Alsir® 2.5%; 20 mg/kg) [65] e a vigilância sistemática de sinais de bem-estar, como por exemplo a ausência de automutilação, ausência de emagrecimento e consumo normal de água e alimento.

As condições mencionadas e o estudo realizado, cumpriram as diretrizes europeias relativamente ao bem-estar animal, nº 63/2010/EU, tendo tido aprovação pelo Comité de Ética do ICBAS/UP.

3.2 Instrumentação

No dia do procedimento, os animais foram trazidos ao laboratório, tendo sido aleatória a sua escolha; procedeu-se à anestesia do animal com quetamina 50 mg/kg intramuscular (Imalgene®, Merial Laboratorios SA, Spain) e xilazina 4 mg/kg (Rompum®, Bayer, Leverkusen, Germany), como indutores da anestesia, sendo esta mantida com metade da dose inicial a cada 20 a 30 minutos, de acordo com eventuais sinais clínicos de superficialização, como por exemplo aumento sustentado de 5 a 10%, durante pelo menos 1 a 2 minutos, da frequência respiratória ou frequência cardíaca.

Subsequentemente, foi feita a tricotomia abdominal e cervical anterior, ao que se seguiu a traqueostomia através duma incisão cervical anterior com cerca de 2 centímetros, afastamento de tecido celular subcutâneo, identificação e isolamento da traqueia, abertura cirúrgica horizontal desta e introdução de tubo traqueal 2,5 (Portex®, Smiths-Medical®, UK), com passagem posterior de fio seda para fixação. Esta manobra, que se destinou a assegurar a via aérea superior do animal, para que a sua permeabilidade se mantivesse ao longo de todo o procedimento, permitiu também conectar o tubo traqueal a um sistema de tipo Jackson-Rees (Figura 1) (Intersurgical®, Sintra, Portugal), que poderia ter um suplemento de oxigénio, de acordo com a fase do estudo que se estava a realizar. A escolha do presente sistema deveu-se à sua elevada portabilidade, às baixas

resistências intrínsecas, e possibilidade de manter constante a mistura de gases frescos no fluxo inspirado [66][67] ao longo do procedimento, quando se procedesse a suplementação com oxigénio.



Figura 1 – Peça T – Maplessen F, com Modificação tipo Jackson-Rees (Intersurgical, Sintra, Portugal)

Seguidamente, foi realizada uma incisão abdominal de cerca de três centímetros, para permitir a exposição do diafragma e a execução da exclusão pulmonar de um dos pulmões. A metodologia utilizada consistiu na administração de dez mililitros/kilograma de ar através do hemi-diafragma esquerdo, no local mais lateral que fosse exequível. Desta forma foi possível visualizar a atelectasia do pulmão

esquerdo, sendo esta confirmação realizada através da visualização pelo centro tendinoso do diafragma (figura 2).

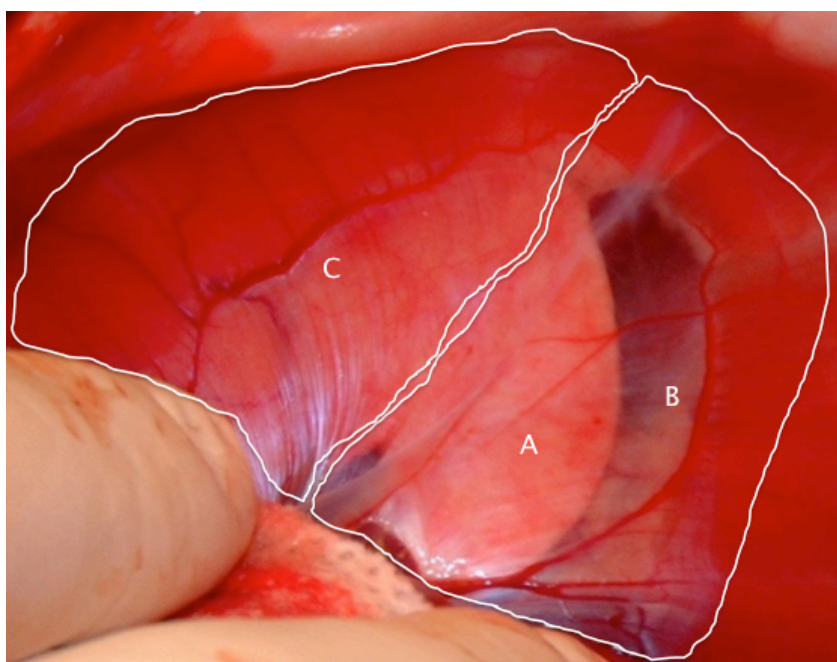


Figura 2 – Face ventral diafragma de coelho: A – pulmão esquerdo atelectasiado, B - Espaço pleural esquerdo, C – Pulmão direito em ventilação espontânea normal.

O presente modelo de exclusão do pulmão esquerdo do processo ventilatório, através da criação de um pneumotorax e subsequente atelectasia do pulmão esquerdo, permitiu manter o animal em ventilação monopulmonar espontânea, neste caso do pulmão direito, ao longo de todo o procedimento.

Esta forma de mimetizar a VMP utilizada no humano apresenta duas diferenças principais, quando comparada com a VMP instituída no bloco operatório no doente anestesiado, que no modelo experimental foram consideradas vantajosas, nomeadamente: a) não

existe manipulação interna do pulmão (não foram usados quaisquer bloqueadores brônquicos ou tubos de duplo lúmen habitualmente usados em contexto de VMP humana em cirurgia torácica [1]), o que poderia, por si só, induzir inflamação ou outro tipo de resposta, e b) não foi usada ventilação mecânica controlada, que a este propósito teve também o objetivo de prevenir a ocorrência de inflamação pulmonar.

Apesar de potenciais dúvidas sobre a exequibilidade desta técnica, nomeadamente no que respeita à possibilidade dos animais virem a falecer durante a experiência, verificou-se que o modelo foi consistentemente reprodutível e que nenhum animal que integrou os estudos referidos nesta dissertação, faleceu durante a experiência, tendo completado os tempos de trabalho originalmente preconizados.

Na série 2 de estudo em que não foi usada VMP a intervenção diafragmática não foi efetivada (administração de ar), tendo os animais sido deixados em ventilação espontânea bipulmonar normal.

A técnica de eutanásia utilizada incluiu a administração de quetamina e xilazina intramuscular em doses de 100 e 8 mg/kg respetivamente, em conjunto com a secção da aorta abdominal para exsanguinação completa.

Após a eutanásia procedeu-se à colheita, em bloco, dos dois pulmões, tendo estes sido imediatamente mergulhados em formaldeído a 10%. Subsequentemente foram embebidos em parafina,

e realizados cortes de três *micra* para posterior coloração em hematoxilina-eosina.

Na primeira e segunda série foram efetuados três cortes em cada pulmão, interceptando o lobo superior, o lobo medio e o lobo inferior.

Na terceira série, procedeu-se à execução de quatro cortes por pulmão, em que no lobo médio se obteve um corte médio-dorsal e um corte médio-ventral. Esta decisão deveu-se ao facto de nesta série se ter questionado, se a adição de oxigénio suplementar em metade dos coelhos da experiência (n=10), estando todos em VMP (n=20), implicaria alguma diferença na intensidade da subsequente resposta inflamatória pulmonar; ou seja, pretendeu-se obter um maior número de preparações histológicas por animal, devido à circunstância de se estar a verificar se a adição de um elemento pró-inflamatório (oxigénio) a outro elemento pró-inflamatório (VMP), poderia corresponder ou não a um efeito aditivo ou sinérgico na intensidade de inflamação pulmonar.

3.3 Monitorização

A monitorização utilizada incluiu uma vertente clínica de observação direta, uma componente de monitorização não invasiva com equipamento *standard*, e uma componente de colheita sanguínea e realização de análises clínicas.

Estas três vertentes não estiveram presentes nas três séries do trabalho. Contudo, opta-se pela sua apresentação e explicação nesta fase da dissertação sendo que, quando adiante se apresentarem os resultados, serão incluídos os valores respetivos de cada modalidade de monitorização usada em cada série do estudo.

A monitorização clínica de observação direta incluiu a frequência respiratória (com 4 registos em cada animal) através da observação da movimentação do tórax do coelho, a existência de eventuais movimentos e a temperatura retal (no início e final do procedimento).

A monitorização não invasiva com equipamento *standard* incluiu a frequência cardíaca e a saturação arterial periférica de oxigénio (Nellcor Oximax N600X®, Covidien, Boulder, CO, USA), com 4 registos em cada animal.

A realização de análises clínicas procedeu-se através da colheita de sangue arterial por punção da artéria aorta na sua porção abdominal, com subsequente análise de gases do sangue arterial (Radiometer ABL 90flex®, Radiometer medical APS, Akandevej 21,

2700 Bronshoj, Denmark) para avaliação de vários parâmetros, como por exemplo a PO_2 e PCO_2 .

Da mesma amostra de sangue procedeu-se à realização de dois hemogramas, no início e no final do procedimento, para avaliação da concentração de elementos figurados no sangue periférico, nomeadamente polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos.

3.4 Histologia

O objetivo do trabalho centrou-se na ocorrência de inflamação pulmonar após ventilação monopulmonar com ou sem suplementação com oxigénio externo. Neste âmbito, foi decidido efetuar preparações para microscopia ótica com coloração de hematoxilina-eosina.

Assim, foram assumidos os seguintes critérios de avaliação dos cortes histológicos: a) ausência de inflamação, b) inflamação ligeira, evidenciada por menos de 15 células inflamatórias agudas do tipo polimorfonucleares por campo de alta ampliação (40 vezes), c) inflamação moderada, de 16 a 25 células por campo, e d) inflamação intensa ou severa, se identificadas mais de 25 células por campo.

Este escalonamento de grau de inflamação quantitativo foi considerado equivalente ao referenciado e atribuído a áreas de inflamação não quantitativas que atingem vários órgãos, incluindo o pulmão [68], que se traduz de forma semelhante e respetivamente por, *inflamação ligeira* – inflamação pouco frequente confinada a pequenas áreas, *inflamação moderada* – uma área de maiores dimensões ou várias áreas de inflamação, e *inflamação intensa* – extensas áreas multifocais com infiltrado celular inflamatório envolvendo todo o tecido pulmonar.

Considerou-se que o alinhamento desta classificação correspondia ao pretendido, uma vez que Lamagna et al [68][69] quando se refere à intensidade de infiltrado inflamatório, incluiu especificamente o pulmão.

A avaliação histológica foi realizada pelo mesmo anatomopatologista, em todas as séries a todas as lâminas, e de modo cego, ou seja, não sendo do seu conhecimento qual a origem da amostra.

Infiltrado inflamatório agudo foi definido como sendo constituído predominantemente por granulócitos.

Tabela 1 – critérios de grau de inflamação pulmonar adotados

Inflamação	Ligeira	Moderada	Intensa
<i>Lamagna et al</i> [68][69]	inflamação pouco frequente confinada a pequenas áreas	uma área de maiores dimensões ou várias áreas de inflamação	Extensas áreas multifocais com infiltrado celular inflamatório com quase todo o tecido afetado
<i>Crítérios quantitativos equivalentes</i>	Até 15 células por campo de alta ampliação (40x)	De 16 a 25 células por campo de alta ampliação (40x)	Mais de 25 células por campo de alta ampliação (40x)

3.5 Análise estatística

Foi utilizado o método da equação de recursos [70] para calcular o tamanho das amostras para vários estudos, nomeadamente o número de animais a incluir em cada grupo de estudos, de forma a garantir uma componente de erro (df) adequada entre 10 e 20. Os animais foram distribuídos aleatoriamente pelos diferentes grupos, sendo também aleatório o local de alojamento no biotério.

O Odds Ratio (OR) foi utilizado como medida de associação entre o grau de inflamação e os diferentes grupos (intervalo de confiança de 95%). O teste não paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar variáveis entre grupos.

O teste de Friedman foi usado para analisar as variações dentro de cada grupo (ANOVA não paramétrica para amostras dependentes).

Para os estudos em que foi colocada a hipótese de que a ocorrência de inflamação era independente do procedimento que estava a ser efetuado, foi utilizado o teste de Chi-quadrado.

O coeficiente de correlação (R) Spearman's rho foi utilizado para analisar a correlação entre diferentes variáveis categóricas e a intensidade de inflamação.

Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Os dados são apresentados como mediana (mínimo – máximo), a não ser que seja indicado o contrário.

O IBM SPSS® 21, a Statistics Matlab® Toolbox da Mathworkse o Microsoft Excel® 2013 foram usados para todos os cálculos.

3.6 Metodologia de divisão das séries de estudo

A presente dissertação procurou responder a três questões, a saber;

1) A circunstância de se ventilar apenas um pulmão (VMP), excluindo o pulmão contralateral da ventilação fisiológica bilateral através da formação de uma atelectasia total, será em si um fator que pode desencadear uma resposta inflamatória pulmonar.

2) O oxigénio, elemento que reconhecidamente pode despoletar inflamação pulmonar em modelos de ventilação controlada, numa base de causa e efeito quantitativa, poderá fazê-lo também num modelo sem ventilação controlada?

3) As potenciais lesões causadas pela VMP, em modelo de ventilação espontânea, poderão ser agravadas pela utilização de oxigénio?

Foram realizadas três séries de experiências para investigar as questões atrás listadas. Estas séries são identificadas de 1 a 3.

3.6.1 Série 1 – Pergunta 1

Foram utilizados 20 coelhos New Zeland que foram divididos aleatoriamente por quatro grupos, com 5 animais por grupo. Os grupos 1 e 2 foram submetidos a VMP, e os grupos 3 e 4 submetidos a ventilação normal bipulmonar (VBP), sendo que os grupos 1 e 3 tiveram um procedimento com a duração de 20 minutos e os grupos 2 e 4, um procedimento com a duração de 75 minutos.

Ao iniciar esta série existia a noção, baseada na bibliografia, que o tempo de procedimento poderia influenciar o resultado, uma vez que, como foi referido anteriormente, a duração da intervenção, e portanto do período de ventilação monopulmonar, poderia aumentar a intensidade da inflamação. Todos os animais receberam suplementação de oxigénio na mistura de gases frescos fornecidos, através de uma peça T – Maplessen F tipo Jackson-Rees, de 2 litros por minuto. Os procedimentos efetuados em termos de anestesia e analgesia dos animais, intervenção cirúrgica para criação da VMP, monitorização, eutanásia e colheitas foram descritos anteriormente.

O anatomopatologista que observou as preparações histológicas (seis fragmentos por animal, sendo do três pulmão esquerdo e três do pulmão direito, intersectando respetivamente o lobo superior, médio e inferior), não tinha a informação sobre a amostra.

Assim, a hipótese colocada nesta primeira série foi de que, a aparecer uma resposta inflamatória, a sua presença e intensidade não

seriam atribuídas ao procedimento de ventilação monopulmonar por si só.

3.6.2 Série 2 - Pergunta 2

Foram selecionados 20 coelhos New Zeland, que foram divididos aleatoriamente em 4 grupos, com 5 animais por grupo. Os grupo 1 e 2 foram submetidos a VBP com suplementação de oxigénio e os grupos 3 e 4 foram mantidos com VBP sem suplementação de oxigénio. Os grupos 1 e 3 tiveram uma duração de procedimento de 20 minutos e os grupos 2 e 4 uma duração de procedimento de 75 minutos.

O estudo do fator tempo como possível elemento agravante da intensidade da inflamação pulmonar que se pudesse vir a induzir, foi também incluído.

O sistema de suplementação com oxigénio foi o mesmo usado anteriormente, ou seja uma peça T – Maplesson F tipo Jackson-Rees. Contudo nesta série apenas se utilizou uma quantidade de 0,5 litros por minuto de gases frescos, no grupo que recebeu suplementação. Nos animais sem suplemento de oxigénio todo o procedimento foi idêntico, com exceção da utilização de oxigénio, ou seja foi deixada a ventilação ao ar ambiente.

Nesta série não foi efetuada a técnica para VMP uma vez que todos os animais foram mantidos em VBP.

As colheitas foram efetuadas como já atrás descrito, nomeadamente para as análise de gases de sangue arterial, e hemograma de sangue periférico.

Estas colheitas foram efetuadas por punção da aorta abdominal, imediatamente após a conclusão de todo o *set-up* experimental, e imediatamente antes da efetivação da eutanásia ao animal. A técnica de anestesia, analgesia e eutanásia foram as mesmas da série 1.

A metodologia de fixação, execução de moldes, corte de fragmentos (seis fragmentos por animal, sendo do três pulmão esquerdo e três do pulmão direito, intersectando respetivamente o lobo superior, médio e inferior), e respetiva coloração obedeceu aos mesmos princípios, atrás referidos.

A visualização das lâminas obedeceu aos mesmos critérios e o mesmo anatomopatologista foi responsável pela sua análise, mantendo-se este, apenas, com a informação codificada das lâminas.

Assim, nesta série, a hipótese colocada foi a de que o suplemento com oxigénio por si só poderia aumentar a resposta inflamatória pulmonar. Neste contexto, a hipótese estatística foi de que a intensidade da inflamação poderia estar associada à suplementação de oxigénio.

3.6.3 Série 3 – Pergunta 3

Foram selecionados 20 coelhos New Zeland que foram divididos aleatoriamente em 2 grupos com 10 elementos cada um, ambos submetidos a ventilação monopulmonar, de acordo como o modelo e técnica descritos anteriormente. Ao grupo 1 foi administrado oxigénio suplementar através de uma peça T – Maplesson F tipo Jackson-Rees, com um débito de 2 litros por minuto. Ao Grupo 2 não foi administrado oxigénio suplementar, tendo sido deixada a ventilação ao ar ambiente. A duração do procedimento foi de 60 minutos nos dois grupos, ou seja, em todos os animais.

A técnica de anestesia, analgesia e eutanásia foram as descritas para as séries anteriores. Procedeu-se a colheitas sanguíneas para análise de gases de sangue arterial (imediatamente após a conclusão do *set-up* experimental e antes da efetivação da eutanásia ao animal) e a monitorização foi a mesma utilizada nas séries anteriores.

A metodologia de observação histológica manteve-se como nas séries anteriores, assim como o anatomopatologista responsável por esta classificação.

Foram observados, nesta série, oito fragmentos por animal, sendo quatro do pulmão esquerdo e quatro do pulmão direito, intersectando respetivamente o lobo superior, médio-dorsal, médio-ventral e inferior.

Os critérios histológicos de intensidade de inflamação acordados, mantiveram-se iguais ao longo das 3 séries de estudo.

A hipótese de trabalho colocada nesta série foi de que o oxigénio por si só não iria influenciar a ocorrência de inflamação pulmonar, uma vez que a ventilação monopulmonar presente poderia ser já um factor que a despoleta ou aumenta [71], tendo sido também utilizado o modelo de VMP espontânea usado até então.

Nesta terceira série, a hipótese estatística foi que a intensidade de inflamação, num contexto de ventilação monopulmonar, será independente de existir ou não suplementação de oxigénio.

4 Resultados

4.1 Séries de estudos

Os resultados obtidos decorreram da organização das respectivas séries de estudos, que por sua vez se relacionam com as respectivas perguntas de investigação.

Na primeira série foram obtidos resultados da monitorização clínica, monitorização não invasiva e análise histológica das lâminas efetuadas a partir dos cortes de pulmão.

Na segunda série foram também obtidos resultados da monitorização clínica, monitorização não invasiva, acrescentando os valores de hemograma inicial e final, análise de gases do sangue inicial e final, e análise histológica das lâminas efetuadas a partir dos cortes de pulmão.

Na terceira série foram igualmente obtidos resultados da monitorização clínica, monitorização não invasiva, análise de gases do sangue e análise histológica das lâminas efetuadas a partir dos cortes de pulmão.

4.2 Resultados obtidos

4.2.1 Série 1

Todos os animais que participaram nesta série de estudo evidenciaram critérios de bem-estar durante a sua permanência no biotério, apresentando hábitos de alimentação e hidratação normais; não houve evidência de automutilação ou perda de peso, tendo as visitas diárias dos investigadores tido resultados considerados normais.

A amostra nesta série apresentou uma mediana de peso de 1975 g no grupo submetido a VMP e 1912,5 g no grupo submetido a ventilação bipulmonar (VBP), não existindo diferenças significativas entre eles.

Sendo o grau de inflamação e a duração do procedimento os dois indicadores em estudo nesta série, no âmbito da variável VMP, será relevante apresentar primariamente os resultados da inflamação pulmonar encontrada, tendo em conta a duração do procedimento.

Assim, observou-se que os coelhos do grupo 1 e grupo 2 (VMP de 20 e 75 minutos respetivamente) tiveram iguais níveis de inflamação pulmonar (OR = 1, Chi-quadrado $p= 0.53$); do mesmo modo, os grupos 3 e 4 (VBP de 20 e 75 minutos, respetivamente) tiveram o mesmo comportamento (OR = 1, Chi-quadrado $p= 0.53$). com os mesmos resultados estatísticos.

Assim, como o grau de inflamação não foi diferente com a duração do procedimento, decidindo-se agregar os grupos 1 e 2 num só grupo denominado grupo de VMP (n=10), e os grupos 3 e 4 num grupo denominado grupo de VBP (n=10), para assim avaliar a influencia da VMP versus VBP, na resposta inflamatória pulmonar, independentemente da duração do procedimento.

Pode constatar-se que durante o procedimento a saturação arterial periférica aumentou significativamente em ambos os grupos ($p<0,05$), com um aumento de 4,5% no grupo VMP e 5,2% no grupo VBP, sem diferenças significativas entre eles.

Os valores iniciais de frequência cardíaca, respiratória e saturação arterial de oxigênio não se correlacionam com o nível de inflamação encontrado. Quando se consideraram todos os animais, apenas a frequência respiratória apresenta uma correlação negativa com o nível de inflamação ($R = - 0.512$, $p<0,05$).

A tabela 2 mostra a evolução dos parâmetros monitorizados ao longo do tempo durante o procedimento experimental (frequência respiratória, cardíaca e saturação arterial O₂).

Tabela 2 – evolução dos parâmetros monitorizados – Série 1

Frequência Respiratória –Série 1				
Coelho	1ª medição	2ª medição	3ª medição	4ª medição
1	82	80	84	85
2	80	75	79	85
3	82	80	90	88
4	78	75	85	84
5	85	85	90	95
6	95	90	98	100
7	85	84	80	90
8	88	89	85	90
9	85	88	90	95
10	85	80	88	90
11	92	94	85	95
12	92	90	97	100
13	85	90	91	95
14	82	80	89	90
15	85	81	80	90
16	82	85	92	95
17	69	65	68	67
18	61	64	62	60
19	56	58	52	50
20	82	86	78	76

Frequência Cardíaca – Série 1				
Coelho	1ª medição	2ª medição	3ª medição	4ª medição
1	201	210	230	225
2	205	200	210	215
3	208	205	210	215
4	200	205	210	208
5	235	230	245	250
6	200	195	198	205
7	150	145	180	190
8	125	145	135	130
9	190	185	175	205
10	130	145	175	180
11	130	132	133	135
12	120	100	95	125
13	160	159	175	181
14	162	170	164	172
15	125	118	130	135
16	160	165	148	155
17	145	150	148	135
18	140	155	160	142
19	190	195	173	160
20	155	158	160	150

Saturação arterial de O2 – Série 1				
Coelho	1ª medição	2ª medição	3ª medição	4ª medição
1	92	93	96	96
2	95	96	95	99
3	91	92	91	91
4	88	90	90	92
5	91	96	94	97
6	90	88	85	94
7	92	90	94	96
8	95	95	96	96
9	92	91	93	94
10	92	94	93	94
11	82	83	94	100
12	92	94	96	100
13	89	90	92	94
14	89	88	94	95
15	85	83	90	89
16	88	89	90	94
17	77	68	75	80
18	81	88	92	96
19	79	77	82	96
20	100	100	100	100

A Tabela 3 mostra a mediana dos valores dos parâmetros monitorizados.

Tabela 3. Mediana de valores dos parâmetros monitorizados série 1

	VMP (ventilação monopulmonar)		VBP (ventilação bipulmonar)	
	1º registo	Último registo	1º registo	Último registo
Frequência cardíaca, batimentos por minuto	190 (120-235)	197,5 (125-235)	152,5 (125-205)	163,5 (130-225)
Frequência respiratória, ciclos por minuto	85 (56-95)	92,5 (50-100)	82 (61-88)	90 (60-95)
SpO ₂ , % (saturação arterial periférica de oxigénio)	91 (79-100)	96 (91-100)	89 (68-95)	94,5 (80-99)

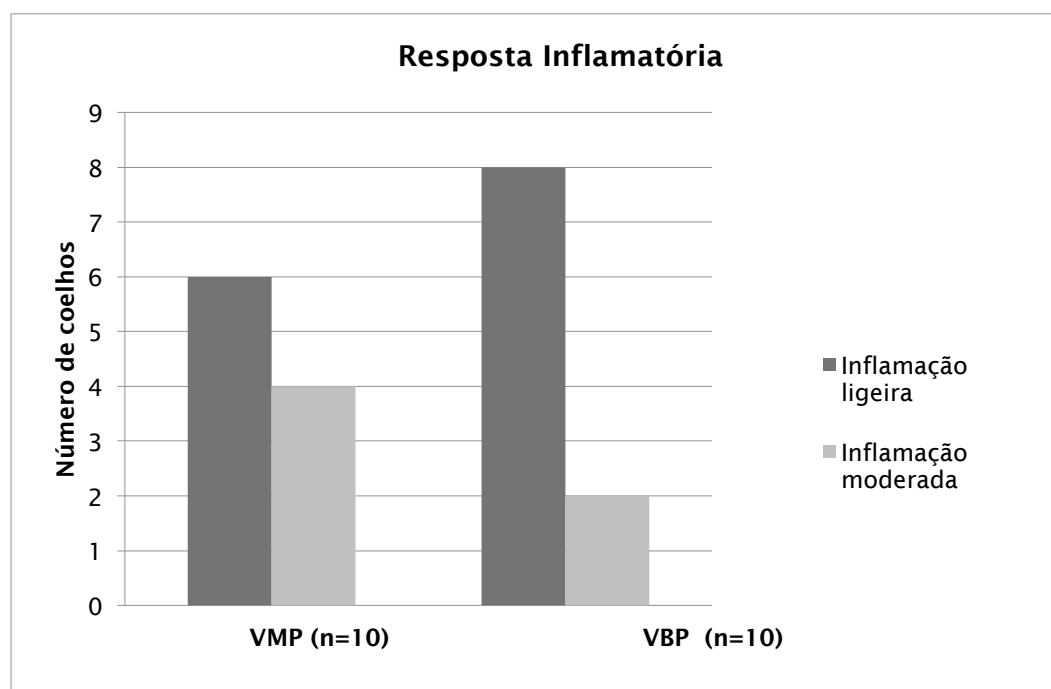
Os valores são apresentados como mediana (mínimo – máximo).

Resultados histológicos

Os animais de ambos os grupos apresentaram algum grau de inflamação. O grupo de coelhos submetidos VMP continha quatro animais com uma resposta inflamatória moderada (16 a 25 células por campo de alta ampliação – 40 x) , enquanto que no grupo submetido a VBP apenas se observou uma resposta desta intensidade em dois dos animais.

A figura 3 mostra a intensidade de inflamação encontrada nos 2 grupos de estudo (VMP e VBP).

Figura 3 – Grau de inflamação – série 1



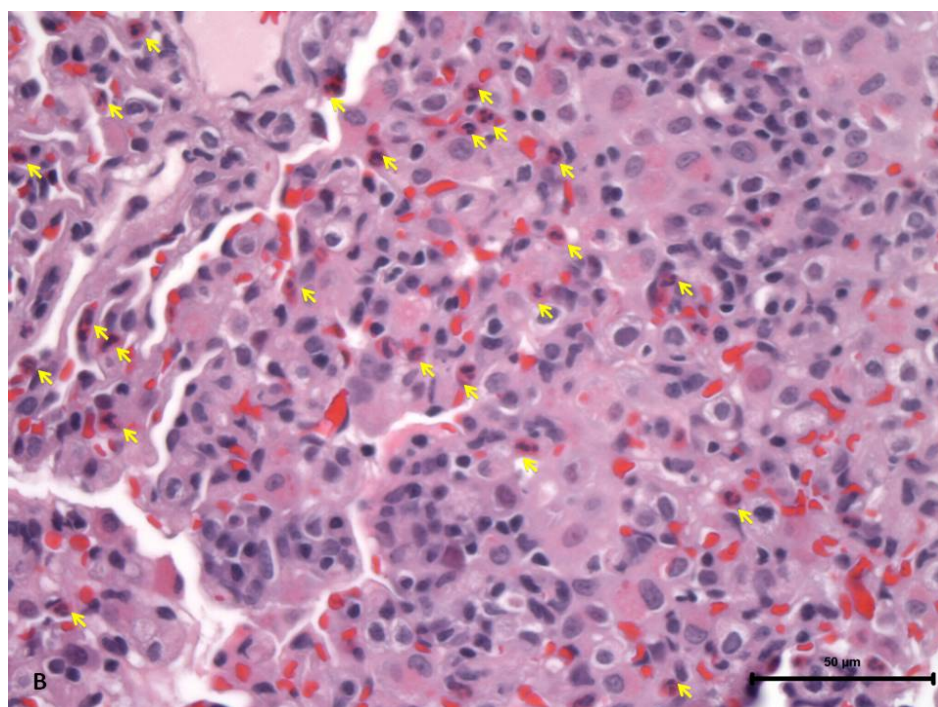
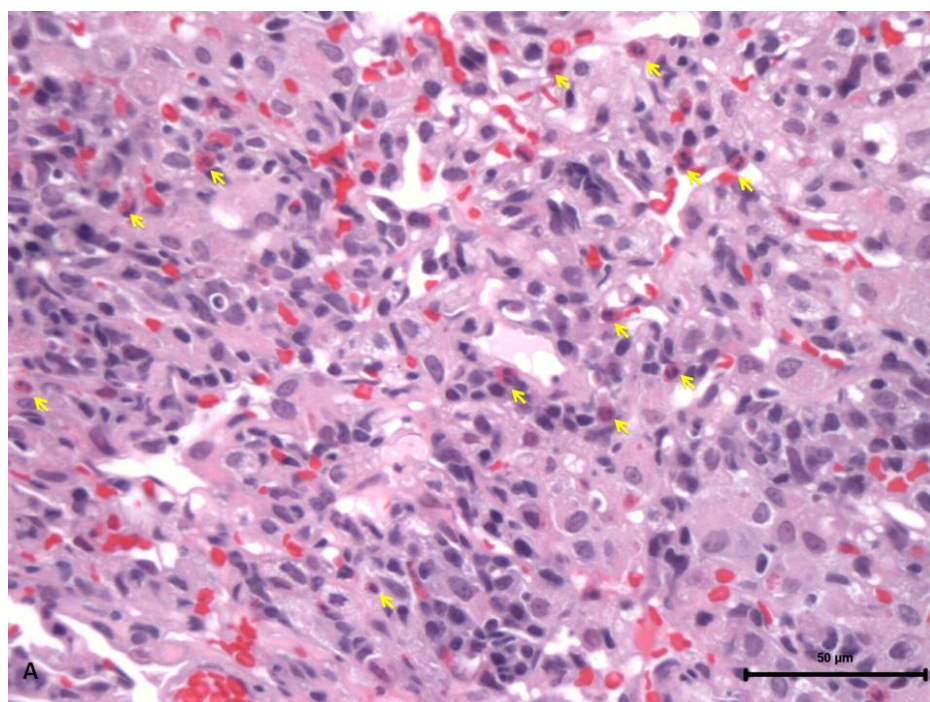
Sendo que a nossa hipótese foi de que a ocorrência de inflamação, nomeadamente a sua intensidade, não era dependente da VMP, esta foi estatisticamente rejeitada (Chi-quadrado com $p < 0,05$).

No grupo de VMP, os resultados encontrados relativamente à intensidade da resposta inflamatória pulmonar foram comparados entre o pulmão esquerdo (excluído ou atelectasiado específica e de forma inerente ao procedimento de VMP) e o pulmão direito que se manteve a ventilar durante o procedimento.

Nesta comparação, observou-se que houve inflamação moderada em maior número de pulmões esquerdos do que direitos (Chi-quadrado com $p < 0,05$).

A análise do tipo de células inflamatórias encontradas mostrou que sendo todas leucócitos polimorfonucleares, cerca de 75% eram eosinófilos e 25% neutrófilos (figura 4).

Figura 4. A - inflamação ligeira, B - inflamação moderada. Setas - polimorfonucleares eosinófilos (Série 1)



4.2.2 Publicação de resultados série 1

Machado HS, Sá P, Nunes CS, Couceiro A, da Silva ÁM, Águas A. Spontaneous one-lung ventilation increases the lung inflammatory response: an experimental pilot study. J Anesth Clin Res 2014. 5:428

Research Article

Open Access

Spontaneous One-Lung Ventilation Increases the Lung Inflammatory Response: An Experimental Pilot Study

Humberto S Machado^{1*}, Paula Sá¹, Catarina S Nunes², António Couceiro³, Álvaro Moreira da Silva⁴ and Artur Águas⁵¹Anesthesiology Department, Centro Hospitalar do Porto, Largo Abel Salazar, 4099-001 Porto, Portugal²Open University, Department of Science and Technology and Anesthesiology Department, Centro Hospitalar do Porto, Largo Abel Salazar, 4099-001 Porto, Portugal³Pathological Anatomy service, Gaia/Espinho Hospital Centre, Rua Conceição Fernandes, 4430 Vila Nova de Gaia, Portugal⁴Intensive care service, Port Hospital Center, Largo Abel Salazar, 4099-001 Porto, Portugal⁵Department of Normal Anatomy, Abel Salazar Biomedical Sciences Institute-University of Porto and Multidisciplinary Biomedical Research Unit, St. Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal**Abstract**

Study objective: The purpose of this study was to investigate if spontaneous one-lung ventilation would induce any type of inflammatory lung response when compared to spontaneous two-lung ventilation and its intensity, by quantification of inflammatory cells in lung histology at the end of the procedure.

Design: In vivo prospective randomised animal study

Setting: University research laboratory

Subjects: New Zealand rabbits

Interventions: Rabbits (n=20) were randomly assigned to 4 groups (n=5 each group). Groups 1 and 2 were submitted to one-lung ventilation, during 20 and 75 minutes respectively; groups 3 and 4 were submitted to two-lung ventilation during 20 and 75 minutes and considered controls. Ketamine/xylazine was administered for induction and maintenance of anesthesia. One-lung ventilation was achieved by administration of air into the interpleural space, and left lung collapse was visually confirmed through the centre of the diaphragm.

Measurements: Lung histology preparations were observed under light microscopy for quantification of the inflammatory response (light, moderate and severe).

Main results: All subjects had at least light inflammatory response. However, rabbits submitted to one-lung ventilation had a statistically significant value for the occurrence of moderate inflammation ($p<0.05$). The inflammatory response found included mainly eosinophils, with an average proportion of 75/25 to other polymorphonuclear cells. No differences between groups were found regarding gas exchange, heart rate and respiratory rate.

Conclusions: In this spontaneous one-lung ventilation model, lung collapse was positively associated with a greater inflammatory response when compared to normal two-lung ventilation.

Keywords: Inflammatory response; One-lung ventilation; Atelectasis

Introduction

Pulmonary complications such as infection and acute lung injury (ALI) may lead to high morbidity rates after thoracic surgery and/or one-lung ventilation (OLV) [1,2]. Inflammation after lung surgery is pointed out as an important cause for the development of ALI [3,4]. The incidence of ALI varies from 2, 5% in patients submitted to thoracic surgery in general to 7, 9% of patients submitted to pneumonectomy [5]. During thoracic surgery several factors can lead to the release of pro-inflammatory mediators (with the subsequent activation of neutrophils that alter endothelial permeability), namely overdistension, hypoxia, hyperoxia and possibly ischemia-reperfusion injury [6]. Also, mechanical ventilation by itself may induce several alveolar changes which are not seen during spontaneous ventilation [6]. In addition, surgical manipulation of the lung may aggravate the alveolar injury with leukocyte recruitment in both lungs during OLV [6]. These findings support the multiple hit hypotheses, in which lung damage during thoracic surgery may be due to: mechanical ventilation, OLV, surgical manipulation, lung overdistension, atelectrauma and re-expansion/reperfusion injury [7]. However, as far as we know, there are no reported studies that show an independent effect of OLV on lung inflammatory response. Thus, in an experimental controlled animal model with spontaneous ventilation, we hypothesized that lung inflammatory response is not increased by one-lung ventilation itself.

Materials and Methods**Animals**

The experimental protocol used in this study was approved by the ethics committee, and carried out according to the European Union Directive n° 63/2010/EU. Twenty adult New Zealand rabbits were purchased from a Portuguese breeder (NORLAP-Rui M.S. Gonçalves, 4825-466 Água-Longa, Portugal) and kept under standard housing conditions with unrestricted access to food and water, with attendance by veterinary doctors and daily inspection. Study inclusion criteria for rabbits were based on general well being status, namely normal food and water ingestion, with absence of self-mutilation and weigh loss.

***Corresponding author:** Humberto S Machado, Department, Centro Hospitalar do Porto, Largo Abel Salazar, 4099-001 Porto, Portugal. Tel: 351 935848475; Fax: 351 220900644; E-mail: h.s.machado@gmail.com

Received May 28, 2014; Accepted August 05, 2014; Published August 10, 2014

Citation: Machado HS, Sá P, Nunes CS, Couceiro A, da Silva AM, et al. (2014) Spontaneous One-Lung Ventilation Increases the Lung Inflammatory Response: An Experimental Pilot Study. J Anesth Clin Res 5: 428. doi:10.4172/2155-6148.1000428

Copyright: © 2014 Machado HS, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Study groups

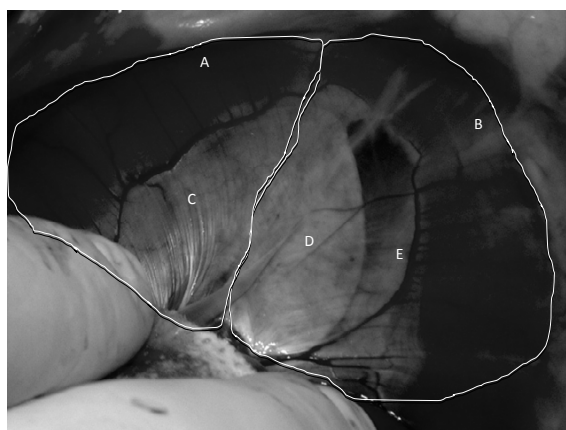
This study was conducted as a prospective randomized animal experiment; with four groups with five rabbits each being studied. Group 1 and 2 had spontaneous OLV during 20 and 75 minutes, respectively; Group 3 and 4 had spontaneous two-lung ventilation (TLV) during 20 and 75 minutes, respectively. All rabbits received 2 litter/minute fresh gas mixture of oxygen and air. Since the TLV group was not submitted to any thoracic instrumentation, just receiving anesthesia as the OLV group, this was assumed to represent the control group.

Instrumentation

The rabbits were anesthetized with intramuscular ketamine 50 mg/kg (Imalgene®, Merial Laboratorios, S.A., and Spain) and xylazine 4 mg/kg (Rompum®, Bayer, Leverkusen, Germany). Anaesthesia maintenance was attained with half the initial dose of ketamine and xylazine every 20 minutes. The anterior region of the neck and the abdomen were shaved, with a 2 cm vertical midline incision being made through the anterior cervical region; after exposing the trachea, an incision was made to allow the introduction of a 2.5 tracheal tube to be connected to a spontaneous breathing system (Jackson-Rees type) with 2 litters per minute flow of a fresh oxygen/air mixture.

Monitoring

During the procedure non-invasive monitoring was used to monitor heart rate (HR) and peripheral arterial saturation (SpO₂) (Nellcor Oximax N600X®, Tyco Healthcare group LP, Nellcor Puritan Bennett Division, Pleasanton, CA 94588, USA); respiratory rate (RR) was monitored by direct observation. First and last measurements were obtained at five minutes after setup and five minutes before the end of the procedure. We developed an OLV model using spontaneous ventilation in order to avoid pro-inflammatory situations previously described as the multiple hit hypotheses (such as mechanical ventilation, surgical manipulations and re-expansion/reperfusion). In all rabbits, a left subcostal incision was performed; In Groups 1 and 2 air injection (10 ml/kg) was administered through the left costal-diaphragmatic recess into the intra-pleural cavity. Left lung collapse was confirmed by visual observation through the centre of diaphragm (by way of its transparency), as was right lung spontaneous ventilation (Figure 1).



A–Basal view of right hemithorax, B–Basal view of left hemithorax, C–Inflated right lung, D– Collapsed left lung, E–left pneumothorax

Figure 1: Rabbit Lung (diaphragmatic ventral aspect).

Groups 3 and 4 were maintained on spontaneous bilateral ventilation (control groups). The rabbit was identified as a suitable model for the study since its anatomy allows OLV due to the anatomic-physiological pleural separation of both sides of the thorax. At the end of procedure all rabbits were euthanized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (8 mg/kg), followed by section of abdominal aorta for exsanguination.

Tissue samples

The rabbits' lungs were harvested and fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin for a light microscopy (LM) study. Three micra sections from the left and right lungs (superior, middle and lower lobe) were obtained from all rabbits. Lung sections were stained in haematoxylin and eosin.

Histopathology

An arbitrarily defined four level inflammatory score was assigned to the lungs depending on the intensity of inflammatory infiltrates in each lung plate: no inflammation, light, moderate and severe inflammation.

Infrequent inflammatory cells and/or inflammation confined to a few areas (corresponding to less than 15 cells per high magnification field of 40x) [8] were defined as a light inflammatory response. Multiple areas in the tissue or a large area of inflammatory cells (corresponding to an average of 16 to 25 cells per high magnification field 40x) [8] were defined as a moderate inflammatory response. Large multifocal areas of tissue with inflammatory cells or almost all areas of tissue affected (corresponding to more than 25 cells per high magnification field 40x) [8] were defined as severe inflammation. Thus, rabbits were classified as light, moderate or severe inflammatory responders according to the intensity of inflammation assessed by total plate visualization. Staff investigators who collected data during the procedure were aware of the group assignments. An independent and experienced pathologist (unaware of which subject was being evaluated) classified all plates accordingly to the criteria set.

Statistical analysis

The Resource Equation method [9] was used to determine if the sample size was appropriate for the experiment, considering a laboratory animal study with a controlled set-up. A sample size of 5 rabbits per group with a total of 4 groups (n=20) were considered adequate for the questions being asked, resulting in an adequate error component (df) between 10 and 20. Odds ratio (OR) was used as a measure of association. Kruskal-Wallis non-parametric test was used to compare variables between groups. Friedman test (Nonparametric two-way ANOVA) was used to compare variations within groups. Spearman's rho was used as a measure of correlation between the different variables and the level of inflammation. Pearson's chi-squared test was used to test for independence in inflammation. The statistical hypothesis is that the occurrence of moderate inflammation is independent of the technique (OLV or TLV). A p-value<0.05 was considered statically significant. The Statistics Matlab® Toolbox from Mathworks, and Microsoft Excel 2013 were used for all calculations. Data is presented with median and range variables.

Results

All rabbits fulfilled the inclusion criteria for the study; daily visits to vivarium demonstrated animal wellbeing, with normal feeding, absence of self-mutilation, or weight loss.

Weight, heart rate (HR), respiratory rate (RR), oxygenation (SpO₂)

The median weight was 1975 g (min 1378; max 3790) in the OLV Group and 1912.5 g (min 1400; max 2433) in the TLV Group, with no statistical difference between the two.

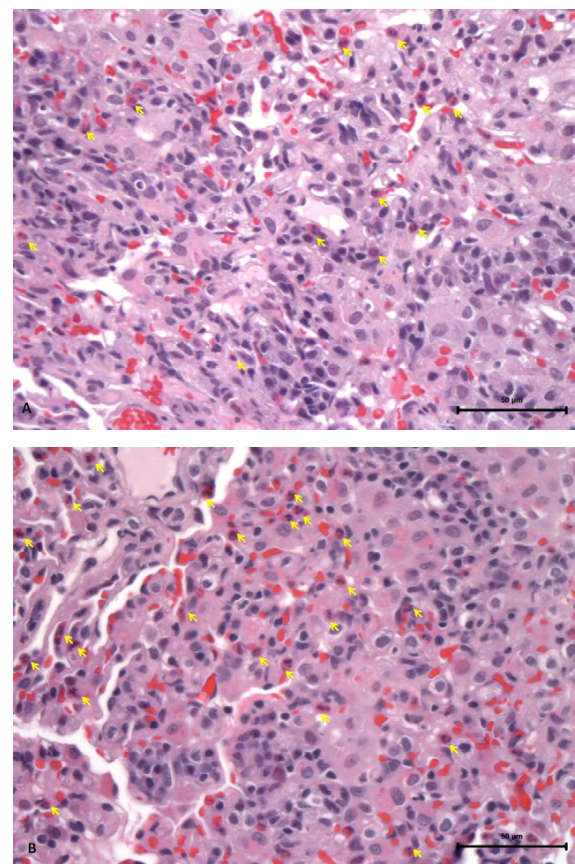
Table 1 summarizes values for all the parameters. During the procedure SpO₂ significantly increased in both groups ($p < 0.05$). In the OLV Group, SpO₂ had a median increase of 4.5% and in the TLV Group SpO₂ increased by 5.2%, with no differences between the groups. Initial SpO₂, HR and RR values are not correlated with the level of inflammation. When considering all rabbits, only the percentage change in RR had a negative correlation with the level of inflammation ($R = -0.512$, $p < 0.05$).

Lung inflammation

Rabbits in Group 1 and 2 were found to be equally likely to have moderate inflammation (OR=1, Chi-square $p = 0.53$). The same was also found in rabbits from Group 3 and 4 (OR=1, Chi-square $p = 0.53$). Since the degree of inflammatory response was not influenced by the length of the procedure, we aggregated the rabbits in only two groups: those submitted to OLV (group 1 and 2-OLV Group, $n = 10$) and those submitted to TLV (group 3 and 4-TLV Group, $n = 10$), so as to analyse the influence of OLV versus TLV, independently of procedure duration. As expected, all rabbits had some degree of inflammation. The OLV Group showed moderate inflammation in 4 subjects, whereas the TLV Group only did so in 2 rabbits. Our hypothesis was that the occurrence of moderate inflammation was independent of the technique used (OLV or TLV), but this was rejected (Chi-square $p < 0.05$). In the OLV Group, inflammation results were compared between left (collapsed) and right lungs; there was moderate inflammation in 4 of the left lungs, whereas only 2 right lungs presented moderate inflammation. This contradicts the hypotheses that the occurrence of moderate inflammation is independent of the lung being collapsed or being ventilated (Chi-square $p < 0.05$). The inflammatory cells found in these plates were neutrophils and eosinophils; the proportion found showed approximately 75% eosinophils and 25% neutrophils (Figure 2).

Discussion

In our study, rabbits submitted to one-lung ventilation (OLV) had greater degree of inflammatory response than did animals submitted to two-lung ventilation (TLV); this fact was shown in more rabbits having moderate inflammation response in the OLV group. In OLV animals, the inflammatory response was more intense in the left lung (collapsed) than in the ventilated lung, suggesting that OLV is not an indifferent factor to the occurrence of more intense inflammation. However, moderate inflammation also appeared in TLV group, which may raise the possibility of a cause also present in the TLV rabbits, but



Legend: arrow-eosinophil

Figure 2: A-Light inflammation (12 eosinophils), B-moderate inflammation (23 eosinophils).

to a lesser extent than in OLV, possibly implicating a systemic effect in these findings. These facts draw our attention to a physiological situation that is present in the collapsed lung without any doubt, and might be present in the ventilated lung with lower intensity, namely areas of atelectasis. Based on this assumption, we may explain why even in a non-surgical spontaneous ventilation model (without interference of mechanical ventilation and surgical manipulation) the local acidic environment induced by atelectasis might induce inflammation, this finding being more pronounced when these areas are more extensive as is the case with whole lung collapse (such as in OLV). In this regard, one might assume that a major local event, such as a collapsed lung, might have the ability to induce a systemic effect affecting both lungs.

No high plateau pressures (barotrauma), no overdistension (volutrauma), nor the shear stress of repetitive opening (atelectotrauma) were present, since the model only included spontaneous ventilation with oxygen/air supplementation of 2 liters/minute. However, as demonstrated in some literature, when these factors were present the length of the procedure may be associated with a greater inflammatory response [10-12]. In all rabbits, spontaneous ventilation set up included a fixed volume of fresh gas flow of 2 liters per minute; this volume allowed visual control of spontaneous ventilation by means of Jackson-Rees balloon self-inflation and deflation observation. It was assumed that this fact implied that a certain degree of continuous positive airway

	OLV (One-lung ventilation)		TLV (Two-lung ventilation)	
	1 st recording	Last recording	1 st recording	Last recording
HR, bpm	190 (120-235)	197.5 (125-235)	152.5 (125-205)	163.5 (130-225)
RR, b/m	85 (56-95)	92.5 (50-100)	82 (61-88)	90 (60-95)
SpO ₂ , %	91 (79-100)	96 (91-100)	89 (68-95)	94.5 (80-99)

Values are presented as mean (range). HR: heart rate; RR: respiratory rate; SpO₂: peripheral oxygen arterial saturation; bpm: beats per minute; b/m: breaths per minute; OLV-One-Lung Ventilation; TLV-Two-Lung Ventilation. There is no statistical difference between the OLV and TLV groups with respect to the 1st and last recordings, or percentage change for all three physical parameters.

Table 1: Physical parameters.

pressure (CPAP) was applied to all animals, which could hypothetically prevent local atelectasis formation. Lung surgery has a 2-6% mortality rate, according to the complexity of the surgical procedures [13]. At the present time, mortality rates have shifted away from the cardiac and surgical causes and are more related to pulmonary problems, such as infection and ALI in its most severe form, the acute respiratory distress syndrome (ARDS) [10,14]. The strongest predictors of ALI are related to the pre-operative condition of the patient, extent of lung resection, "injurious" mechanical ventilation and fluid therapy during the surgical procedure [13]. It is known that controlled OLV with higher tidal volumes (10 ml/kg) may produce a significant rise of inflammatory markers, including increased cellular infiltration [15]. Other causes of release of inflammatory mediators are hyperoxia and high levels of positive pressure at the end of inspiration [16,17]. In addition, studies showed that biochemical and histological lesions occur both in the collapsed and in the ventilated lung during OLV [18,19]. The ventilated lung may be subjected to a combination of volutrauma, hyperinflation, and hyperoxia that represents a potential source of oxidative stress and inflammatory response [20]. However, none of the situations previously described have been applied in this study. This draws attention to the possibility that the occurrence of moderate inflammatory response might be linked to the OLV status itself. Inflammation is characterized by profound changes in metabolic activity, tissue hypoxia and metabolic acidosis. These shifts in tissue metabolism are frequently associated with vasculitis and intense recruitment of various inflammatory cell types [21]. Furthermore, it is clear that oxygen supplementation in all subjects may increase the possibility of inflammation, since oxygen itself may induce the occurrence of atelectatic areas [22,23]. These areas are poorly ventilated and induce local hypoxia, with the consequent signalling of inflammatory mediators. However, both groups had oxygen supplementation, but the OLV group had higher moderate inflammation scores, implying that OLV clearly augments inflammatory response. The overall inflammatory response cell population found was composed of neutrophil and eosinophil leukocytes. However, in all plates the percentage of eosinophil leukocytes reached 75%, which was an unexpected inflammation pattern. Eosinophils are involved in several inflammatory processes that imply a certain degree of pro-fibrogenic and pro-angiogenic activity, namely in some chronic allergic conditions such as asthma. This angiogenesis is often linked to hypoxic conditions present in inflamed tissues. Since eosinophils respond to hypoxia by up-regulation and other pro-angiogenic functions, this indicates that there may be a correlation between eosinophilic inflammation and hypoxia [23,24]. In our study, we did not suspect allergic conditions since all rabbits were considered healthy by the overall clinical analysis made at arrival and during quarantine time; with no abnormal clinical signs or symptoms being detected during the whole housing period. In addition, all rabbits had an official health certificate from the producer certifying the animals' wellbeing. Thus, eosinophilic predominance may be related to local hypoxic conditions. The results of this study show that some factors linked to the oxygen supply during OLV (and subsequent set up of oxygenation variability) may play a role not only in the occurrence of inflammatory response, but also on the type of cells encountered. Local hypoxia may have prompted inflammatory signalling, which might have been responsible for the appearance of either neutrophils and/or eosinophils. Considering all rabbits, the percentage of change in RR had a negative correlation with the level of inflammation ($p < 0.05$); thus, it may be assumed that this increase in RR may lower systemic carbon dioxide levels and its correspondent contribution to acidity during inflammation.

The main findings in this study include:

- Spontaneous one-lung ventilation in a non-surgical, non-manipulated lung, induces inflammatory changes in both lungs, with predominance in the collapsed lung.
- Atelectasis is present not only in the collapsed one-lung ventilated lung, but may also be present in two-lung ventilated subjects, however, with a more pronounced inflammatory response in the first.
- Inflammatory cellular infiltrates that result from a certain degree of lung atelectasis and local hypoxia, were predominantly eosinophilic in nature.

The conclusion of this study is that OLV (assumed as a major factor of atelectasis) is a relevant trigger for lung inflammation and, since no controlled ventilation was used, nor surgical manipulation of the lung was performed, this inflammatory response can be a direct physiological consequence. Study limitations were identified during our work and may contribute to plan further investigation. This spontaneous ventilation animal model was created to study the histological consequences of OLV. However, no previous studies were done that established a time limit for an experiment like the one carried out. In this regard, it was assumed that a seventy-five minute limit on the length of procedure was acceptable, as it might represent some similarity to the majority of thoracic procedures; however, further studies might contribute data regarding what is the ideal procedure duration in the study of the effects of OLV. Likewise, this study setup is not comparable to clinical OLV; in which positive pressure ventilation and lung exclusion using double-lumen tracheal tubes or bronchial blockers are used. Thus, further studies should be designed to allow the extrapolation to human clinical practice in order to know how to avoid consequences of atelectasis during and after anesthesia.

Acknowledgement

The authors would like to thank Mr. Costa e Silva for coordinating the housing and husbandry of animals, Mrs. Manuela Silva for help in laboratory tasks, and Dr. Ana Pinto and Dr. Madalena Costa for histological assembling and preparation.

The authors would like to thank Centro Hospitalar do Porto for the funding granted for the purchase of animals, animal food, and other husbandry expenses, as also the Anesthesia Department at Centro Hospitalar do Porto for funding the edition and publication of this study.

Disclosures

This study received funding from Centro Hospitalar do Porto (Largo Abel Salazar, 4099-001 Porto, Portugal) for logistic purposes, animal purchase, housing and husbandry. The Anesthesia Department at Centro Hospitalar do Porto (Largo Abel Salazar, 4099-001 Porto, Portugal) funded expenses regarding edition and publication. No funding was granted to any author.

References

1. Licker MJ, Widikker I, Robert J, Frey JG, Spiliopoulos A, et al. (2006) Operative mortality and respiratory complications after lung resection for cancer: impact of chronic obstructive pulmonary disease and time trends. See comment in PubMed Commons below *Ann Thorac Surg* 81: 1830-1837.
2. Boffa DJ, Allen MS, Grab JD, Gaissert HA, Harpole DH, et al. (2008) Data from The Society of Thoracic Surgeons General Thoracic Surgery database: the surgical management of primary lung tumors. See comment in PubMed Commons below *J Thorac Cardiovasc Surg* 135: 247-254.
3. Licker M, Fauconnet P, Villiger Y, Tschopp JM (2009) Acute lung injury and outcomes after thoracic surgery. See comment in PubMed Commons below *Curr Opin Anaesthesiol* 22: 61-67.
4. Eichenbaum KD, Neustein SM (2010) Acute lung injury after thoracic surgery. See comment in PubMed Commons below *J Cardiothorac Vasc Anesth* 24: 681-690.
5. Dulu A, Pastores SM, Park B, Riedel E, Rusch V, et al. (2006) Prevalence and

- mortality of acute lung injury and ARDS after lung resection. See comment in PubMed Commons below *Chest* 130: 73-78.
6. Della Rocca G, Coccia C (2013) Acute lung injury in thoracic surgery. See comment in PubMed Commons below *Curr Opin Anaesthesiol* 26: 40-46.
 7. Kozian A, Schilling T, Röcken C, Breiting C, Hachenberg T, et al. (2010) Increased alveolar damage after mechanical ventilation in a porcine model of thoracic surgery. See comment in PubMed Commons below *J Cardiothorac Vasc Anesth* 24: 617-623.
 8. Lamagna C, Scapini P, A van Ziffel J, DeFranco AL, Lowell CA (2013) Hyperactivated MyD88 signaling in dendritic cells, through specific deletion of Lyn kinase, causes severe autoimmunity and inflammation.
 9. Mead R (1988) The design of experiments. (Edn 1) Cambridge University Press, Cambridge, New York.
 10. Baudouin SV (2003) Lung injury after thoracotomy. See comment in PubMed Commons below *Br J Anaesth* 91: 132-142.
 11. Takenaka K, Nishimura Y, Nishiuma T, Sakashita A, Yamashita T, et al. (2006) Ventilator-induced lung injury is reduced in transgenic mice that overexpress endothelial nitric oxide synthase. See comment in PubMed Commons below *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L1078-1086.
 12. Jordan S, Mitchell JA, Quinlan GJ, Goldstraw P, Evans TW (2000) The pathogenesis of lung injury following pulmonary resection. See comment in PubMed Commons below *Eur Respir J* 15: 790-799.
 13. Mithos P, Katsaragakis S, Theodorou D, Milingos N, Skottis I (2006) The degree of oxidative stress is associated with major adverse effects after lung resection: a prospective study. See comment in PubMed Commons below *Eur J Cardiothorac Surg* 29: 591-595.
 14. Licker MJ, Widtker I, Robert J, Frey JG, Spiliopoulos A, et al. (2006) Operative mortality and respiratory complications after lung resection for cancer: impact of chronic obstructive pulmonary disease and time trends. See comment in PubMed Commons below *Ann Thorac Surg* 81: 1830-1837.
 15. Licker M, Fauconnet P, Viliger Y, Tschopp JM (2009) Acute lung injury and outcomes after thoracic surgery. See comment in PubMed Commons below *Curr Opin Anaesthesiol* 22: 61-67.
 16. Schilling T, Kozian A, Kretschmar M, Huth C, Welte T, et al. (2007) Effects of propofol and desflurane anaesthesia on the alveolar inflammatory response to one-lung ventilation. See comment in PubMed Commons below *Br J Anaesth* 99: 368-375.
 17. Quinn DA, Moufamej RK, Volokhov A, Hales CA (2002) Interactions of lung stretch, hyperoxia, and MIP-2 production in ventilator-induced lung injury. See comment in PubMed Commons below *J Appl Physiol* (1985) 93: 517-525.
 18. Wilson MR, Choudhury S, Goddard ME, O'Dea KP, Nicholson AG, et al. (2003) High tidal volume upregulates intrapulmonary cytokines in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. See comment in PubMed Commons below *J Appl Physiol* (1985) 95: 1385-1393.
 19. Tekinbas C, Ulusoy H, Yulug E, Erol MM, Alver A, et al. (2007) One-lung ventilation: for how long? See comment in PubMed Commons below *J Thorac Cardiovasc Surg* 134: 405-410.
 20. Sakao Y, Kajikawa O, Martin TR, Nakahara Y, Hadden WA 3rd, et al. (2001) Association of IL-8 and MCP-1 with the development of reexpansion pulmonary edema in rabbits. See comment in PubMed Commons below *Ann Thorac Surg* 71: 1825-1832.
 21. Jordan S, Mitchell JA, Quinlan GJ, Goldstraw P, Evans TW (2000) The pathogenesis of lung injury following pulmonary resection. See comment in PubMed Commons below *Eur Respir J* 15: 790-799.
 22. Nissim Ben Efraim AH, Eliashar R, Levi-Schaffer F (2010) Hypoxia modulates human eosinophil function. See comment in PubMed Commons below *Clin Mol Allergy* 8: 10.
 23. Kilpatrick B, Slinger P (2010) Lung protective strategies in anaesthesia. See comment in PubMed Commons below *Br J Anaesth* 105 Suppl 1: i108-116.
 24. Karhausen J, Haase VH, Colgan SP (2005) Inflammatory hypoxia: role of hypoxia-inducible factor. See comment in PubMed Commons below *Cell Cycle* 4: 256-258.

Citation: Machado HS, Sá P, Nunes CS, Couceiro A, da Silva AM, et al. (2014) Spontaneous One-Lung Ventilation Increases the Lung Inflammatory Response: An Experimental Pilot Study. *J Anesth Clin Res* 5: 428. doi:10.4172/2155-6148.1000428

Submit your next manuscript and get advantages of OMICS Group submissions

Unique features:

- User friendly/feasible website-translation of your paper to 50 world's leading languages
- Audio Version of published paper
- Digital articles to share and explore

Special features:

- 350 Open Access Journals
- 35,000 editorial team
- 21 days rapid review process
- Quality and quick editorial, review and publication processing
- Indexing at PubMed (partial), Scopus, EBSCO, Index Copertina and Google Scholar etc
- Sharing Option: Social Networking enabled
- Author, Reviewers and Editors rewarded with online Scientific Credits
- Better discount for your subsequent articles

Submit your manuscript at: <http://www.omicsonline.org/submit>

4.2.3 Série 2

Todos os animais nesta série de estudo evidenciaram, igualmente critérios de bem-estar durante a sua permanência no biotério, com alimentação e hidratação normais; não existiu evidência de automutilação ou perda de peso, tendo as visitas diárias dos investigadores tido resultados considerados normais.

Nesta série, também o grau de inflamação e a duração do procedimento foram os dois indicadores em estudo, contudo a variável agora em causa foi a suplementação com oxigénio. Deste modo, será relevante apresentar em primeiro lugar os resultados da inflamação pulmonar encontrada, tendo em conta a duração do procedimento.

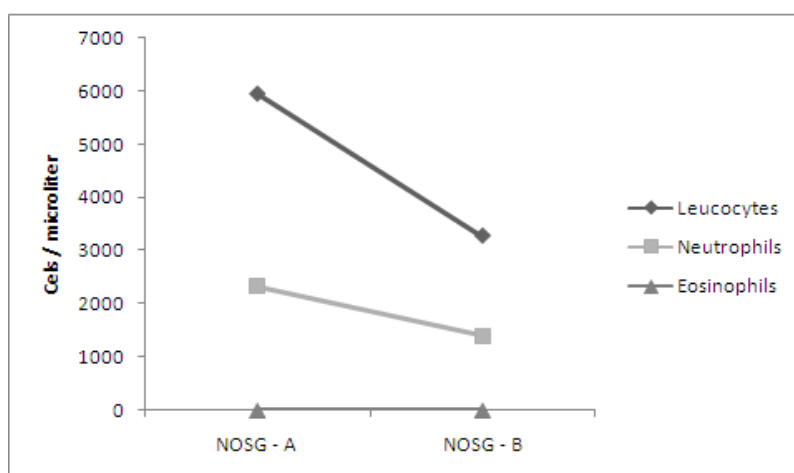
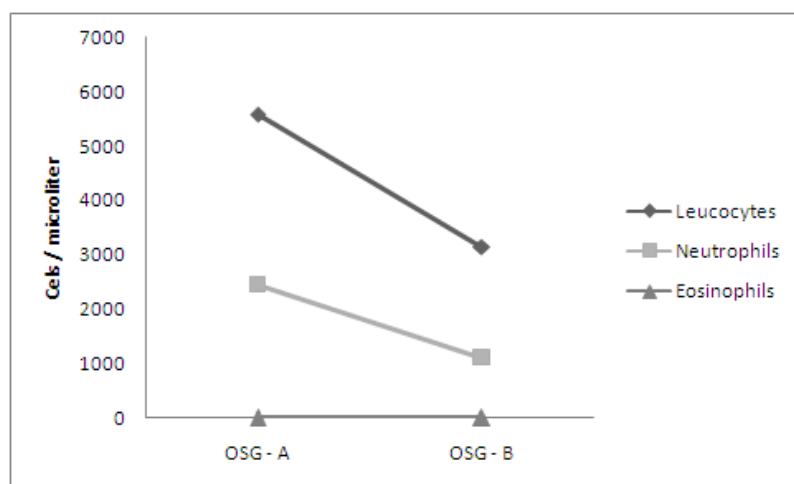
Assim, pode referir-se que a resposta inflamatória encontrada nos grupos 1 e 2 foi idêntica (OR =1), tal como sucedeu com os grupos 3 e 4 (OR =1). Observou-se que o fator tempo não levou a nenhuma diferença nos resultados e por isso, foi possível agregar os grupos 1 e 2 no grupo de suplementação com oxigénio – grupo OSG (n=10), e os grupos 3 e 4 no grupo sem suplementação de oxigénio – grupo NOSH (n=10).

A subsequente análise de resultados foi efetuada com base nesta agregação de grupos.

Nesta série, como anteriormente referido, foram feitas colheitas de sangue periférico para análise de gases de sangue arterial e hemograma.

Na figura 5 relatam-se os valores dos hemogramas no início e final do procedimento.

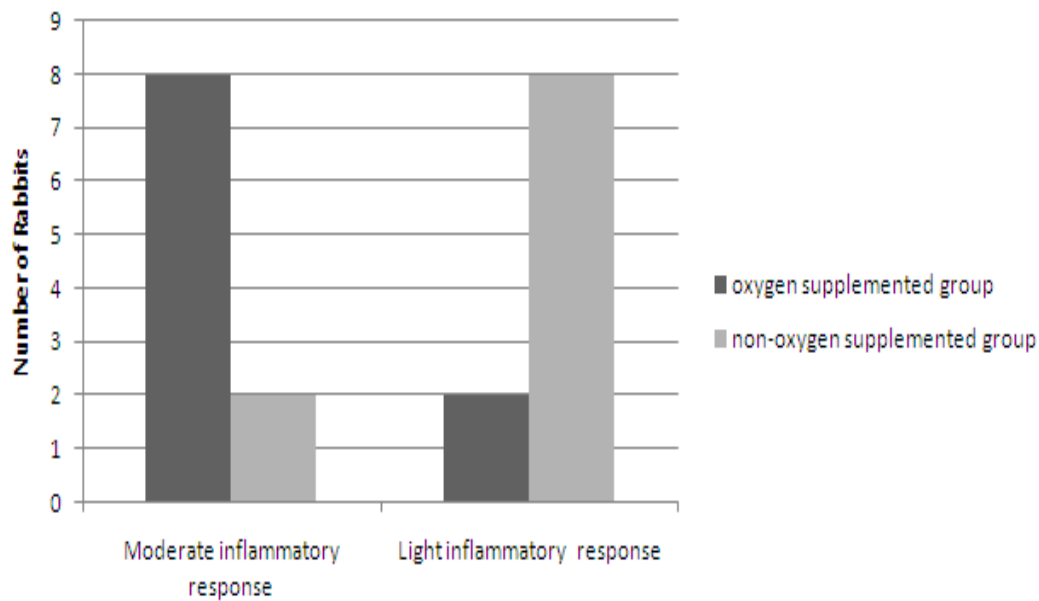
Figura 5. Resultados da contagem diferencial de leucócitos inicial (A) e final (B) em ambos os grupos OSG (com suplemento de oxigénio) e NOSG (sem suplemento de oxigénio) – Série 2



Resultados histológicos

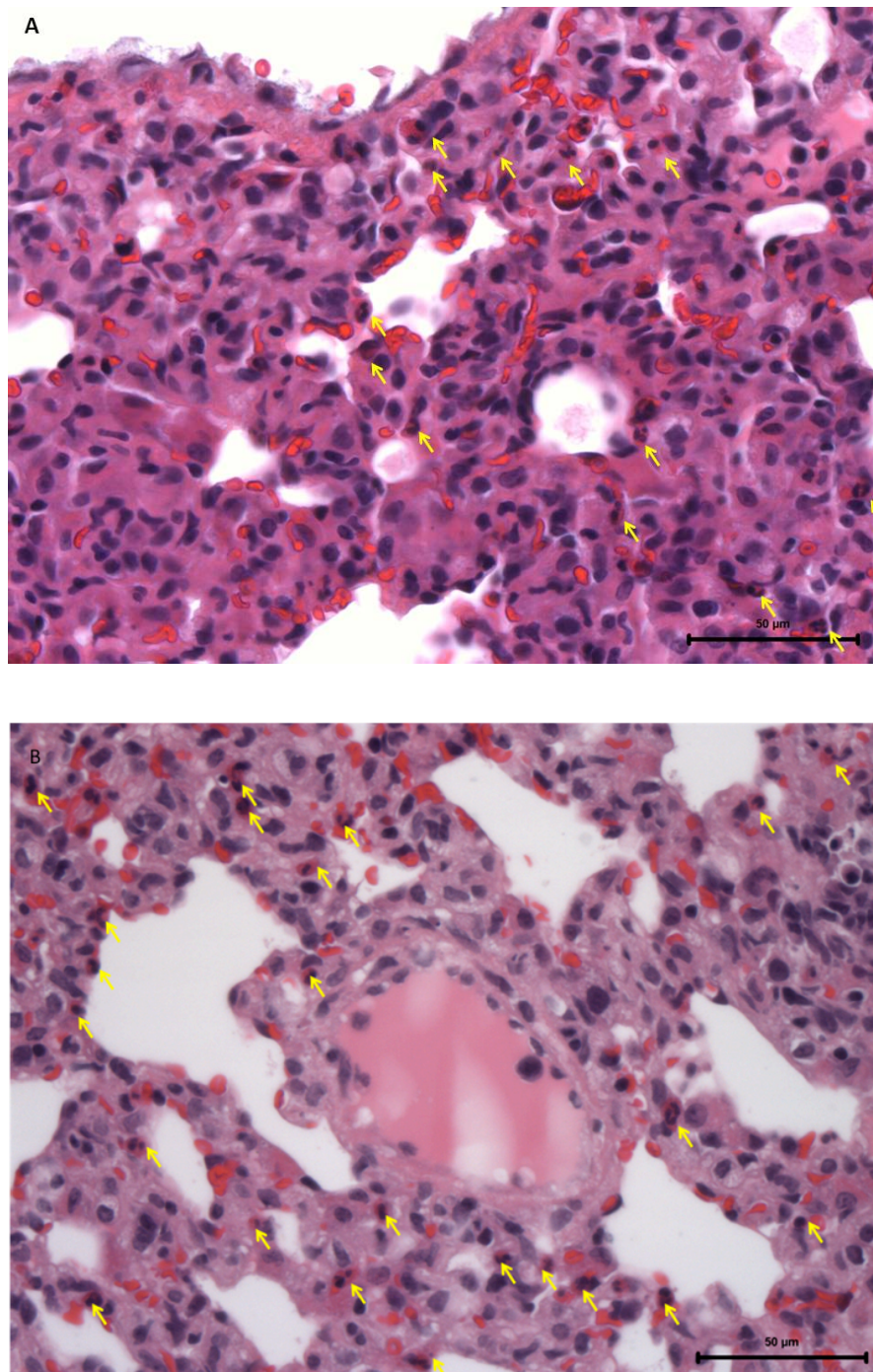
Na figura 6 ilustra-se o grau de inflamação encontrada (OR=16, Intervalo confiança a 95% [1,8-143,2])

Figura 6. Grau de inflamação nos grupos OSG e NOSC



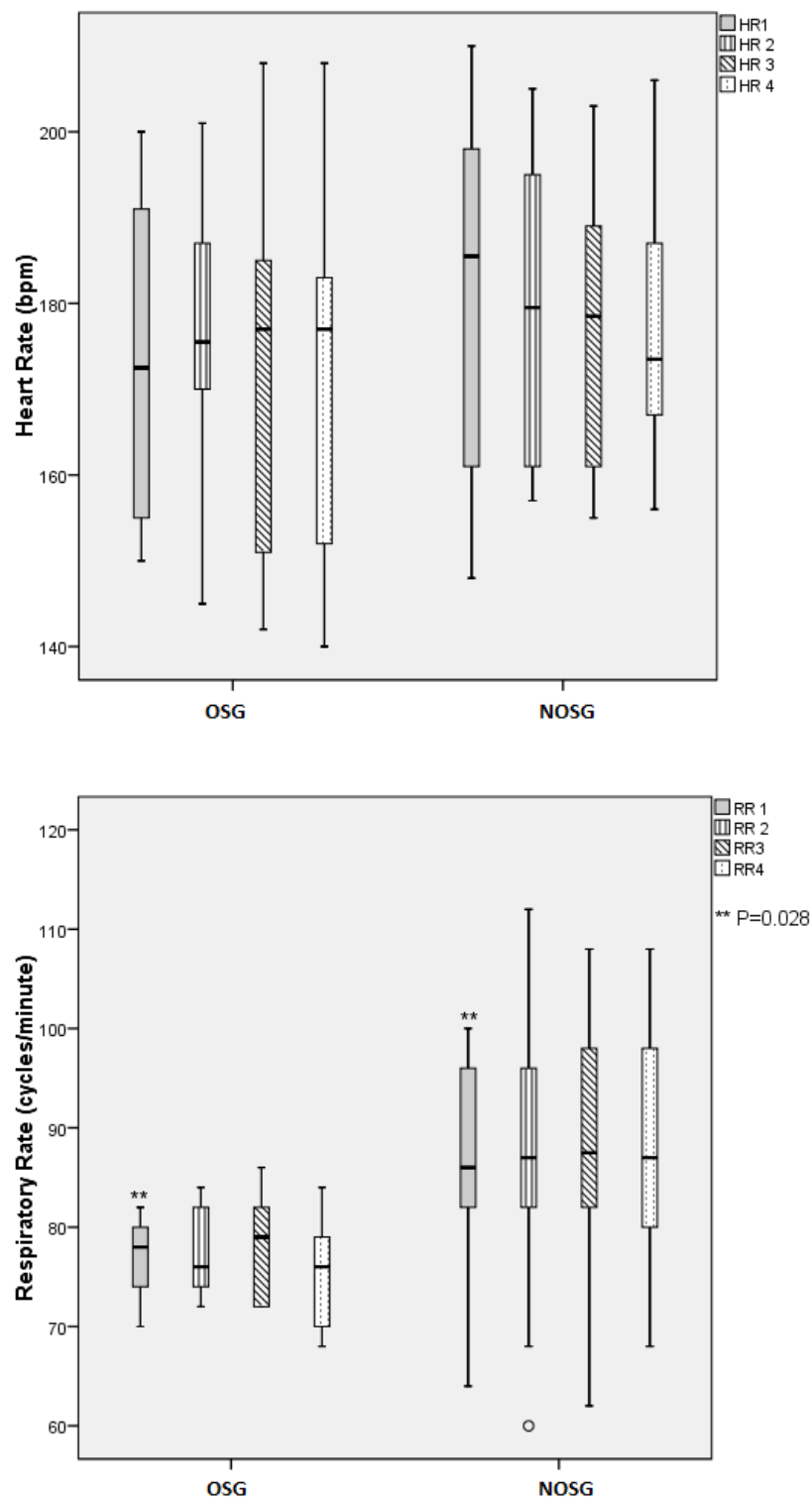
Na figura 7, ilustra-se a presença do infiltrado inflamatório agudo de polimorfonucleares, com uma proporção de neutrófilos para eosinófilos de cerca de 20 para 80%, respetivamente.

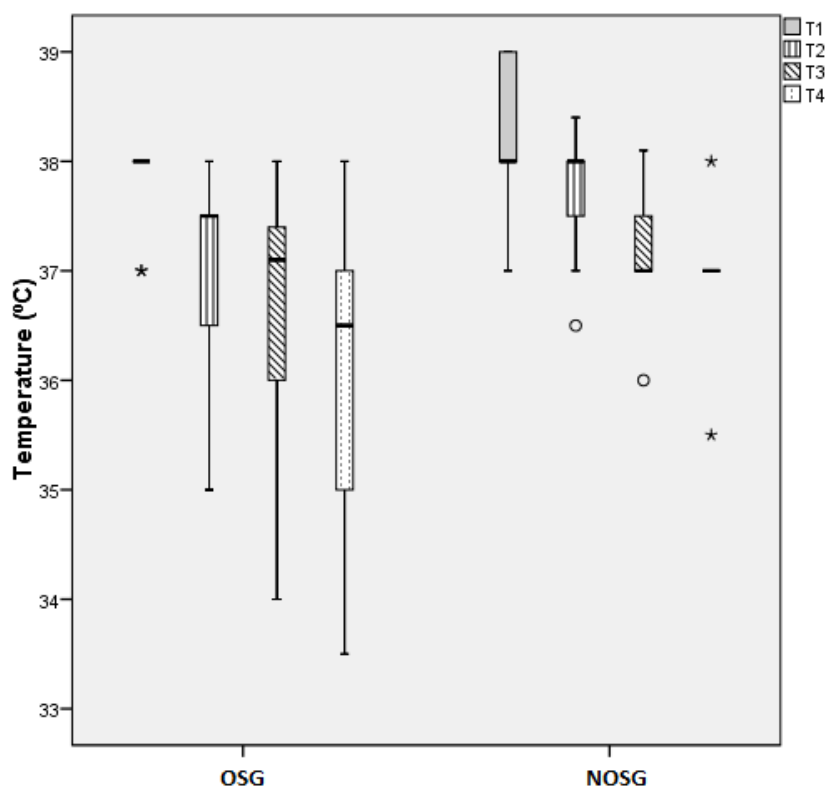
Figura 7. Resposta inflamatória. A- inflamação ligeira, B- inflamação moderada. Setas – polimorfonucleares eosinófilos (Série 2).



A figura 8 documenta os valores que foram monitorizados, ao longo do tempo do procedimento.

Figura 8. Parâmetros fisiológicos monitorizados na série 2. *Frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura.* OSG - grupo com suplementação de oxigênio, NOSG - grupo sem suplementação de oxigênio





A mediana da frequência cardíaca (FC) na primeira medição não foi diferente entre os grupos e não mudou significativamente ao longo do procedimento.

A mediana da frequência respiratória (FR) foi diferente entre grupos ($p=0,028$), mas não mudou significativamente durante o procedimento em ambos os grupos.

As primeiras medições de temperatura não foram estatisticamente diferentes entre os grupos, mas diminuíram significativamente durante o procedimento ($p < 0,001$), 3,9% no OSG e 2,6% no NOSG, sendo que esta diminuição não foi estatisticamente diferente entre grupos.

Uma diferença significativa foi encontrada entre os dois grupos na primeira medição de gases de sangue arterial, nomeadamente na pressão parcial de oxigénio arterial (pO_2) e na saturação arterial de oxigénio (SpO_2).

No final do procedimento a mediana da pO_2 aumentou 8,89% no grupo com suplementação de oxigénio (OSG), tendo aumentado 81,33% no grupo sem suplementação de oxigénio (NOSG), este aumento foi estatisticamente diferente entre grupos ($p < 0,05$).

A SpO_2 não se alterou significativamente entre a primeira e a última medição no grupo OSG, mas aumentou significativamente em 13,36% no grupo NOSG ($p < 0,05$) (figura 8).

Os restantes parâmetros analisados não mostraram diferenças significativas entre a primeira e última medição entre grupos de estudo (OSG e NOSG).

Apresentam-se seguidamente os valores de gases de sangue arterial dos animais estudados na Série 2, tabela 4.

Tabela 4 - Valores de gases de sangue arterial. Amostra A - inicial, Amostra B - final. pH - pH do sangue arterial, pCO₂ - pressão parcial de dióxido de carbono arterial, pO₂ - pressão parcial de oxigénio arterial, HCO₃ - concentração arterial de bicarbonato, SatO₂ - saturação arterial de oxigénio

Coelho Amostra	Grupo OSG									
	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
pH	7,36	7,25	7,28	7,414	7,312	7,291	7,385	7,485	7,348	7,375
PCo2	54,3	65,6	76,9	39	64,3	61,2	61	46,3	66,7	45,8
PO2	44,6	43,1	177	107	232	53,2	265	350	73,2	275
HCO3	30,5	28,9	37,5	24,9	32,5	26,4	36,5	34,9	33,5	26,8
Sat O2	78,2	62,7	99	99	99	87,7	99	99	98,8	99

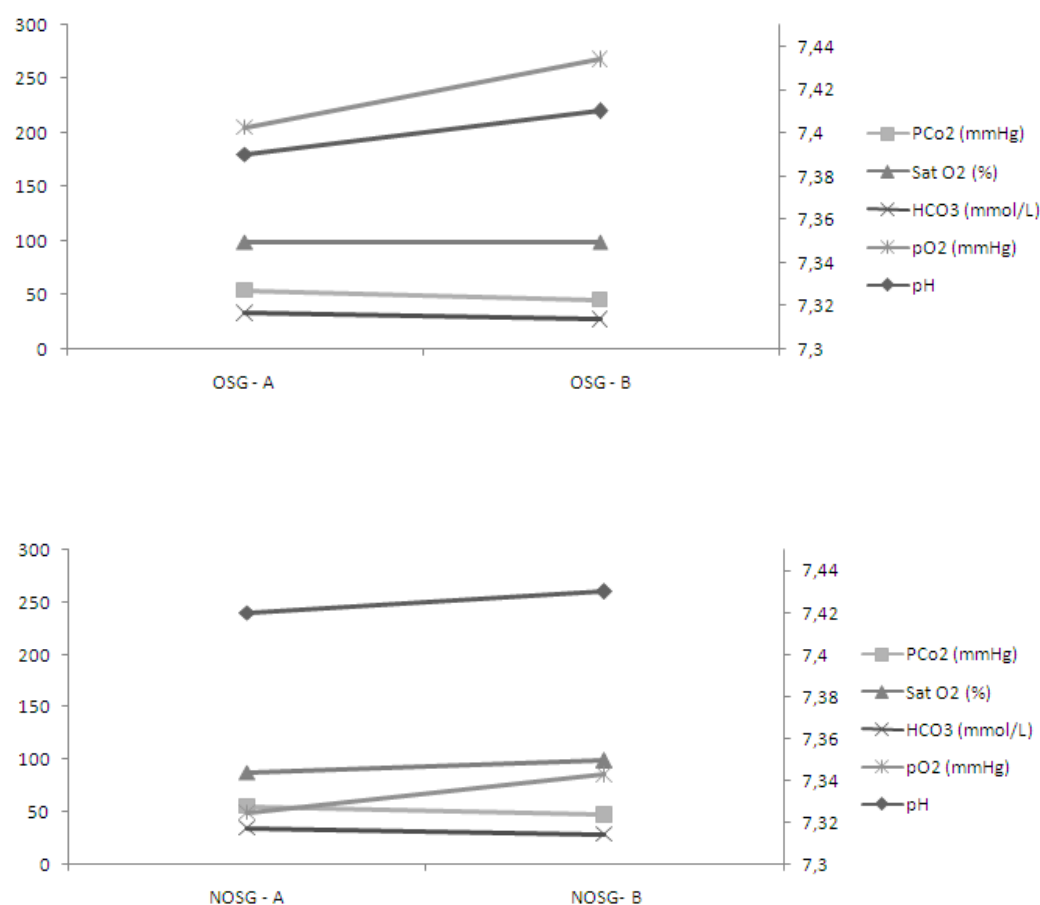
Coelho Amostra	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
pH	7,429	7,396	7,413	7,414	7,395	7,562	7,413	7,467	7,421	7,48
PCo2	54,6	45	52,1	46,7	50,5	26,8	51,4	43,6	53,1	36,2
PO2	235	371	96,5	261	153	161	313	318	295	332
HCO3	36,1	27,6	33,2	29,9	30,9	24,1	32,8	31,5	34,5	26,9
Sat O2	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99

Coelho Amostra	Grupo NOSG									
	11	11	12	12	13	13	14	14	15	15
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
pH	7,336	7,413	7,447	7,498	7,445	7,343	7,444	7,358	7,438	7,446
PCo2	70,6	54,5	49,3	33,7	55,1	38,2	45,4	45,9	58,7	55,8
PO2	26,6	85,4	62,4	111	55,2	102	80,3	85,9	41,5	68,4
HCO3	37,7	34,8	32,8	26,1	37,8	20,8	31,1	25,8	37,1	36,7
Sat O2	40,8	99	100	99	94,4	99	99	99	72,4	93,1

Coelho Amostra	16	16	17	17	18	18	19	19	20	20
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
pH	7,436	7,497	7,403	7,423	7,405	7,496	7,388	7,444	7,379	7,307
PCo2	59,9	48,5	51,9	45,9	55,2	36,1	64,1	52,1	54,9	48,9
PO2	33,9	57,8	51,3	75,3	55,4	137	33,8	67,5	46,8	99,4
HCO3	37,8	36,9	30,8	29,9	34,6	27,8	35,1	34,4	32,3	24,5
Sat O2	68,7	99	89,9	99	94,9	99	62,1	99	84,9	99

A figura 9 mostra a evolução dos valores de gases de sangue arterial nos dois grupos de estudo (mediana)

Figura 9 (Série 2) - OSG - A, primeira medição no grupo OSG (com suplemento de oxigénio); OSG - B, última medição no grupo OSG; NOSG - A, primeira medição no grupo NOSG (sem suplementação de oxigénio); NOSG - B, ultima medição no grupo NOSG. pO_2 -pressão parcial de oxigénio arterial, PCO_2 -pressão parcial de dióxido de carbono arterial, HCO_3 -concentração de bicarbonato arterial, pH -pH do sangue arterial.



4.2.4 Publicação dos resultados da série 2

Machado HS, Nunes CS, Sá P, Couceiro A, da Silva ÁM, Águas A. Increased lung inflammation with oxygen supplementation in tracheotomised spontaneous breathing rabbits: an experimental prospective randomized study. BMC Anesthesiology 2014.14:86

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Increased lung inflammation with oxygen supplementation in tracheotomized spontaneously breathing rabbits: an experimental prospective randomized study

Humberto S Machado^{1*†}, Catarina S Nunes^{1,2†}, Paula Sá^{1†}, Antonio Couceiro^{3†}, Álvaro Moreira da Silva^{4†} and Artur Águas^{5,6†}

Abstract

Background: Mechanical ventilation is a well-known trigger for lung inflammation. Research focuses on tidal volume reduction to prevent ventilator-induced lung injury. Mechanical ventilation is usually applied with higher than physiological oxygen fractions. The purpose of this study was to investigate the after effect of oxygen supplementation during a spontaneous ventilation set up, in order to avoid the inflammatory response linked to mechanical ventilation.

Methods: A prospective randomised study using New Zealand rabbits in a university research laboratory was carried out. Rabbits (n = 20) were randomly assigned to 4 groups (n = 5 each group). Groups 1 and 2 were submitted to 0.5 L/min oxygen supplementation, for 20 or 75 minutes, respectively; groups 3 and 4 were left at room air for 20 or 75 minutes. Ketamine/xylazine was administered for induction and maintenance of anaesthesia. Lungs were obtained for histological examination in light microscopy.

Results: All animals survived the complete experiment. Procedure duration did not influence the degree of inflammatory response. The hyperoxic environment was confirmed by blood gas analyses in animals that were subjected to oxygen supplementation, and was accompanied with lower mean respiratory rates. The non-oxygen supplemented group had lower mean oxygen arterial partial pressures and higher mean respiratory rates during the procedure. All animals showed some inflammatory lung response. However, rabbits submitted to oxygen supplementation showed significant more lung inflammation (Odds ratio = 16), characterized by more infiltrates and with higher cell counts; the acute inflammatory response cells was mainly constituted by eosinophils and neutrophils, with a relative proportion of 80 to 20% respectively. This cellular observation in lung tissue did not correlate with a similar increase in peripheral blood analysis.

Conclusions: Oxygen supplementation in spontaneous breathing is associated with an increased inflammatory response when compared to breathing normal room air. This inflammatory response was mainly constituted with polymorphonuclear cells (eosinophils and neutrophils). As confirmed in all animals by peripheral blood analyses, the eosinophilic inflammatory response was a local organ event.

Keywords: Lung inflammation, Oxygen supplemented spontaneous breathing

* Correspondence: hjs.machado@gmail.com

[†]Equal contributors

¹Serviço de Anestesiologia, Centro Hospitalar do Porto, Largo Abel Salazar, Porto 4099-001, Portugal

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Machado et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Background

Patients submitted to mechanical ventilation are at risk of developing acute respiratory distress syndrome (ARDS), either by overdistension (volutrauma) or repetitive tidal recruitment of closed lung units (atelectrauma) [1]. Overinflation of the more distal airways and alveoli is thought to be caused by high tidal volumes. The cycle of continuous opening and closing of alveolar groups also causes alveolar wall lesion and surfactant depletion, with injury by recruitment-derecruitment [2]. Continuous mechanical distension of type II alveolar cells contributes to an inflammatory response by changing the balance of pro and anti-inflammatory mediators [3]. Ventilation strategies near physiological values benefit patients from these conditions [1]. Post-operative lung inflammation and ARDS may also appear in less severe forms [4,5], especially when overinflation is relevant [6]; however other pro-inflammatory factors may be present [7].

Oxygen has been characterized as a pro-inflammatory factor. Supra-physiological oxygen concentrations, as in mechanical ventilation, have been implied as a contributing factor to the development of lung injury; as described by Britt et al., newborn mice exposed to hyperoxia developed lung inflammation linked to cyclooxygenase pathways [8]. Lung injury by oxygen may occur as a result of injurious oxygen by-products (reactive oxygen species, ROS), and other key mediators (interferon-gamma) secondary to hyperoxia [9,10]. The type of oxygen toxicity to the lung has been found to be due to natural killer cell's activation and proliferation in hyperoxic environments [11]; several levels of hyperoxia may play different roles on lung inflammation [12,13].

Nevertheless, available evidence shows that hypoxia [4,14] may also play an important role in the development of lung inflammation. If high oxygen content is applied to the lung, reabsorption atelectasis may develop, with resulting local hypoxemic environments; this fact may lead to a regional acidic milieu that results in subsequent inflammatory response [4]. Furthermore, continued hypoxia leads to an increased level of circulating pro-inflammatory cytokines and vascular leakage causing lung edema [14].

We hypothesized that supplementary oxygen may lead to enhanced lung inflammation, as a sole contributing factor. Therefore, we studied an animal model based on a spontaneous ventilation mode so as to avoid any bias from mechanical ventilation. Furthermore, exposure time to supplementary oxygen was also studied.

Methods

Animals

The experimental protocol used in this study was approved by appropriate local ethic committee ("Comité de Ética do ICBAS/UP"), and was done according to the European Union Directive n° 63/2010/EU. Twenty adult

New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were purchased from a Portuguese breeder (NORLAP – Rui M.S. Gonçalves, 4825–466 Água-Longa, Portugal) and were kept under standard housing conditions with unrestricted access to food and water, attended by veterinary doctors and inspected daily for wellbeing monitoring.

Study groups

This study was conducted as prospective randomized animal experiment; we studied four groups with five rabbits each. Groups 1 and 2 had supplementary oxygen with 20 and 75 minutes procedure respectively; Groups 3 and 4 had no supplementary oxygen with the same procedure duration (20 and 75 min). No controlled ventilation was used in any group.

Instrumentation

All rabbits (mean weight of 2057 grams [g], std 227.19 g) were submitted to anesthesia with ketamine (100 milligrams [mg]/milliliter [ml] - Imalgene®, Bayer - Puteaux, France) and xylazine (20 mg/ml - Rompum®, Bayer HealthCare, Bayer Inc., Animal Health Division, Toronto, Canada), with an initial dose 0.5 ml/kilogram [kg] of each of these drugs, supplemented intramuscularly with half dose every 20 minutes; animals were placed in the supine position and were kept this way during the whole procedure. Subsequently, the anterior region of the neck and abdomen were shaved and a 2 centimeter [cm] vertical midline incision was made on the anterior cervical region; after exposing the trachea, an incision was made so as to allow the introduction of a 2.5 tracheal tube to be connected to a spontaneous breathing system (Jackson-Rees type), with a fresh flow of oxygen of 0.5 liters [l] per minute in the oxygen supplemented group; no oxygen supplement was used in the non-supplemented group.

Monitoring

Non-invasive monitoring was used to monitor heart rate, (nellcor oximax N600X®, Covidien, Boulder, CO, USA), rectal temperature and respiratory rate; values were collected every ten minutes after finishing the experimental setup. After tracheal intubation and supplementary oxygen in groups 1 and 2, an infra-abdominal incision was performed in all rabbits to allow aortic blood sample collection; these were collected at the beginning and just before termination of the procedure; blood was further analyzed for arterial blood gas and peripheral blood cell count determination.

Tissue sampling

At the end of procedure all rabbits were euthanized with ketamine - xylazine 1 ml/kg of each drug, followed by section of abdominal aorta for exsanguination.

Rabbit lungs were harvested and fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin, for light microscopy (LM) study. Three micra sections of each lung lobe (superior, middle and lower) were obtained from all rabbits. Lung sections were stained in hematoxylin and eosin.

Histopathology

An arbitrarily defined 4 level inflammatory score was used to classify the lungs according to the intensity of inflammatory infiltrates in each lung plate: no inflammation, light, moderate and severe; light inflammation indicates infrequent inflammatory cells and/or inflammation confined to a few areas [15] (corresponding to less than 15 cells per high magnification field 40×). Moderate inflammation was defined as multiple areas in the tissue or a large area of inflammatory cells [15] (corresponding to an average of 16 to 25 cells per high magnification field 40×). Large multifocal areas of tissue with inflammatory cells or almost all areas of tissue affected were defined as severe inflammation [15] (corresponding to more than 25 cells per high magnification field 40×).

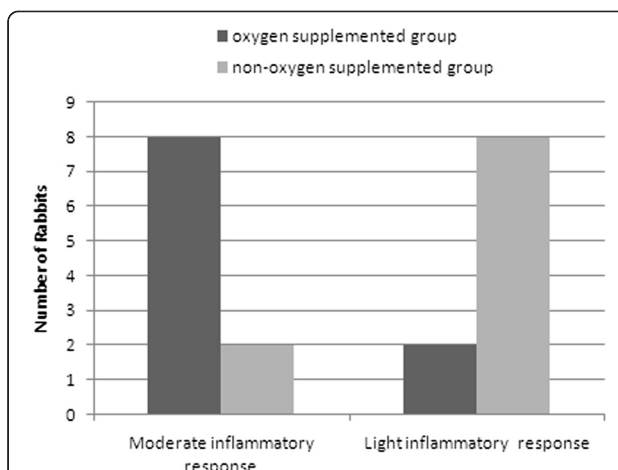


Figure 2 Lung inflammatory response. Moderate and mild inflammatory response in the OSG - oxygen supplemented group (n = 10) and NOSG - non-oxygen supplemented group (n = 10) (OR = 16).

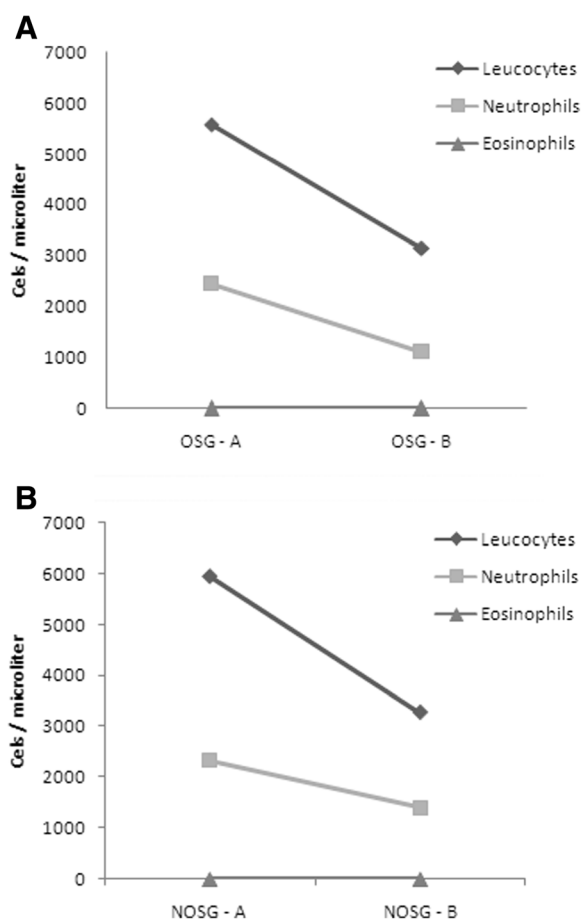


Figure 1 Peripheral white cell count. Legend: (A) first measurement, (B) final measurement at end of procedure, in OSG - oxygen supplemented group and in NOSG - non-oxygen supplemented group.

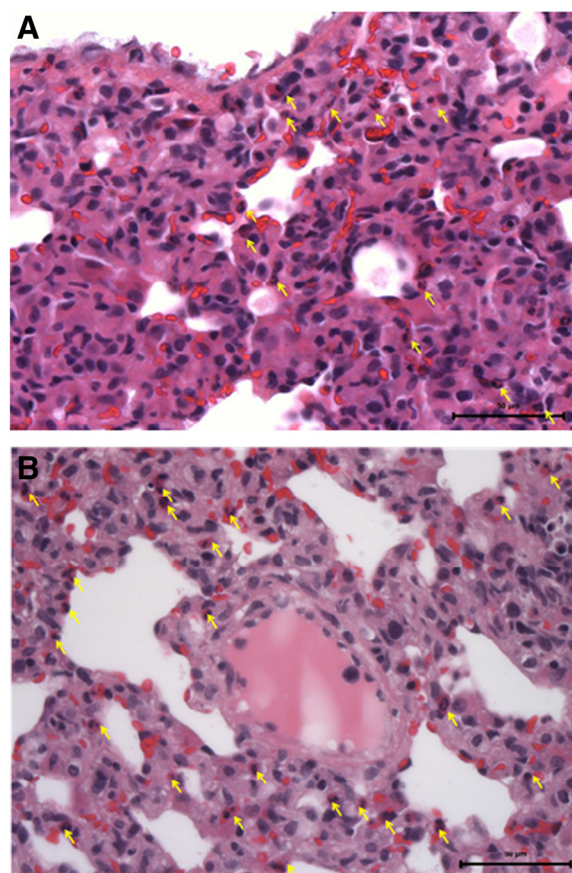


Figure 3 Inflammatory cells. A - Light inflammation, B - Moderate inflammation, Arrows - eosinophils.

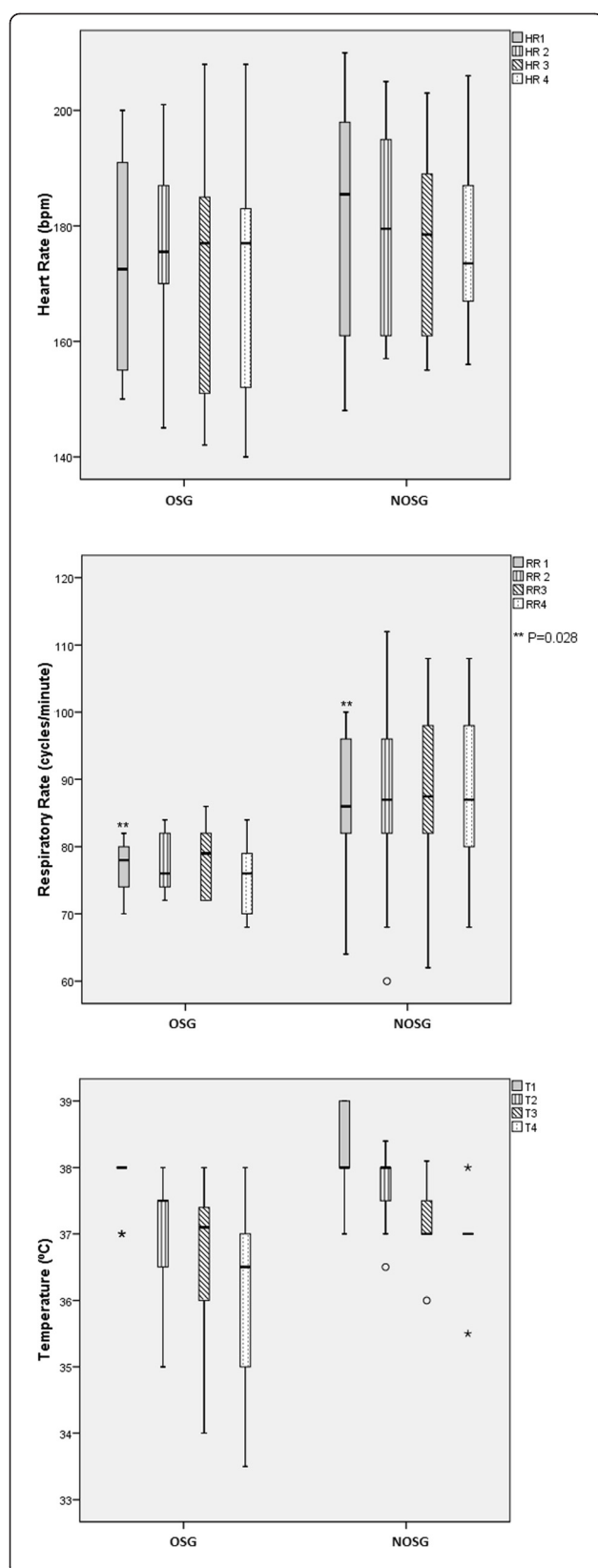


Figure 4 Physiological parameters during procedure. Median measures of heart rate, respiratory rate and temperature in OSG - oxygen supplemented group and NOSG - non-oxygen supplemented group, during procedure.

Thus, rabbits were classified as light, moderate or severe inflammatory responders according to the intensity of inflammation assessed. Staff investigators in the animal laboratory were aware of group assignments. After laboratory lung harvesting and plate preparation, these were sent to an independent pathologist for histological scoring. The pathologist was unaware of group assignments. The results founded were accepted as valid.

It was also planned that if the duration of procedure did not influence the degree of inflammation, group 1 (n = 5) and group 2 (n = 5) would be joined, as *oxygen supplemented group* (OSG) (n = 10), and group 3 (n = 5) and group 4 (n = 5) joined in a *non-oxygen supplemented group* (NOSG) (n = 10) in a similar way.

Statistics

The Resource Equation method [16] was used to determine if the sample size was appropriate for the experiment. A sample size of 5 rabbits per group with 4 groups (total n = 20) was considered adequate for the questions being asked, resulting in an adequate error component (df) between 10 and 20. Odds ratio (OR) was used as a measure of association between the inflammatory outcome and the study groups (95% confidence interval - CI). Kruskal-Wallis non-parametric test was used to compare variables between groups. Friedman test (Nonparametric two-way ANOVA) was used to compare variations within groups. A p-value < 0.05 was considered statically significant. The IBM SPSS Statistics 21 and Statistics Matlab® Toolbox from Mathworks were used for all calculations. Data is presented with median and range variables.

Results

Lung inflammation

All groups showed signs of moderate lung inflammation. Rabbits in Groups 1 and 2 were equally likely to have moderate inflammation (OR = 1). The same was found in group 3 and 4 (OR = 1) rabbits. Therefore, it was possible to aggregate the rabbits into two groups, those who had supplementary oxygen, (n = 10), and those who did not have supplementary oxygen (n = 10), since procedure duration did not influence the occurrence of inflammatory response. Thus, subsequent analysis was done considering only two groups, with or without oxygen supplement, OSG and NOSG, respectively.

The first median values of peripheral cell count measurement are shown in Figure 1. OSG showed moderate inflammation in 8 out of 10 subjects, whereas NOSG

only did so in 2 rabbits, with an OR = 16 (CI 1.8-143.2); therefore OSG is more likely to have moderate inflation than the other group (Figure 2). The inflammatory cells found in these histological plates were neutrophils and eosinophils; with a proportion of about 80% eosinophils and 20% neutrophils (Figure 3).

Heart rate, ventilatory rate, temperature and oxygen levels during the experiment

All animals survived the experiments and euthanasia was performed in order to collect lung samples. The median heart rate on first measurement was not different between groups (Figure 4) and did not change significantly during the procedure. The median respiratory rate (first measurement) was different between groups (Figure 1) ($P = 0.028$), but in both groups did not change significantly during the procedure. First measurement values for temperature were not statistically different between the two groups, but decreased significantly during procedure ($P < 0.001$) (Figure 4). The median rectal temperature (first measurement) was 38 degrees Celsius in the OSG and 38 degrees Celsius in the NOSG. In the OSG the median temperature decreased -3.9% , and in the NOSG the temperature decreased -2.6% (this decrease was not statistically different between groups).

A significant difference was found between the two groups in the first measurement values of arterial blood gas, namely partial oxygen pressure (pO₂) and peripheral

arterial saturation (Sat O₂). At the end of the procedure the median pO₂ increased by 8.89% in the OSG, and by 81.33% in the NOSG, this change was significantly different ($P = 0.041$). Sat O₂ did not change (between first and final measurement) for the OSG, but it increased significantly by 13.36% in the NOSG (Figure 5).

Discussion

Our data showed that the observed inflammatory response was more pronounced in the oxygen supplemented group, with a hyperoxic environment, a fact also found in other studies [17-19]; however it was predominantly constituted of eosinophils (80%) and to a minor extent by neutrophils (20%). This observation of the cellular content of the acute inflammatory response was unexpected; nevertheless, some evidence presented in literature might give some reasonable explanation for this occurrence. The common cells found in studies in which acute inflammatory response is observed are usually neutrophils and/or monocytes/macrophages [20-22]; however, the myeloid series implication on inflammation has been linked to a hypoxic model, with lactate accumulation and metabolic acidosis [22]. It is recognized that the eosinophil is armed with weapons able to kill helminthes and to damage tissues and cause disease [23]. In addition, eosinophils exhibit some properties that may support why we found them as the first representatives of acute

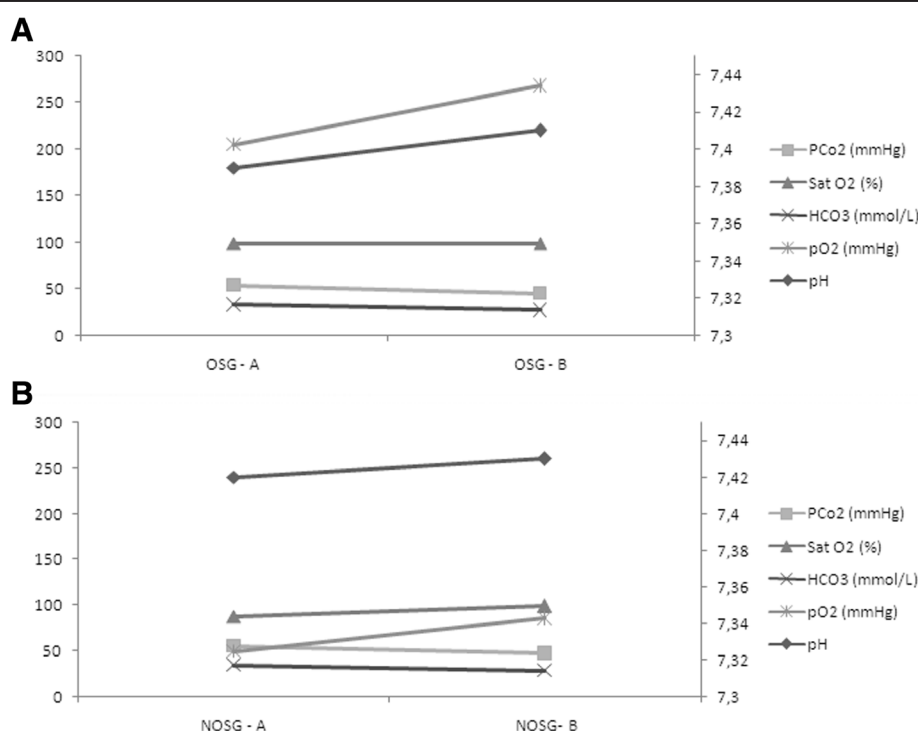


Figure 5 Arterial blood gas analysis. Arterial blood gas analysis at beginning of procedure (A) and at end of procedure (B) in OSG - oxygen supplemented group and NOSG - non-oxygen supplemented group.

inflammatory response [23]. These characteristics include the ability to migrate through endothelial cells without degranulation and without inducing vasculitis, its remarkable adherence capacity after minimal rolling to change its shape, and very quick spreading on the endothelial cell monolayer [23].

Moreover, one could question the animals' initial health status, and an eventual eosinophil infiltration with a systemic expression. In regard to this, peripheral blood cell analysis was consistent with a healthy rabbit population in both groups, with special importance to the near absent peripheral eosinophil count (Figure 1). This fact draws away from the possibility of an eosinophil diseased rabbit population, which could be responsible for the lung infiltrates found.

Despite the more pronounced acute inflammatory infiltrate found in the OSG, with eosinophil predominance, this might seem to conflict with data showing hypoxia as a modulator of human eosinophil function [24]. This modulation might be expressed as an up-regulation on their survival [24]. However, the local consequence of oxygen supplementation is a hypoxic acidic environment, due to alveolar collapse arising from hyperoxia reabsorption atelectasis.

In our study, oxygen supplemented spontaneous ventilated animals had more pronounced inflammatory response than non-supplemented subjects, without influence from procedure duration. This fact is reasonably well documented [17-19], since oxygen is known as a possible trigger of inflammation. The association of controlled ventilation and hyperoxia are known as key synergetic factors responsible for ventilator induced lung injury (VILI) [20]. Our data in this spontaneous breathing model represents new insight in this matter, since previous known evidence (also in rabbits) shows that short term models for controlled ventilation might not trigger significant inflammatory responses [25]. As stated, we wanted to study the oxygen supplementation impact in a spontaneous model; the data presented showed that, even in this setting, oxygen itself plays one role in triggering inflammation as compared to room air ventilation.

Thus, it is reasonable to assume that as long as oxygen was used (even in a reduced exposure time of 20 minutes) in this spontaneous ventilation animal model, inflammation was immediately triggered and further enhanced as a moderate response. Potential atelectasis formation due to oxygen supplementation is widely described in literature [4]. This fact might explain a more pronounced inflammatory response in this group, because atelectasis correspond to a local phenomenon that induces local hypoxia and subsequent inflammatory signaling [4], with clear modification on cells life cycles and properties [8].

Being oxygen a known induction agent of absorption atelectasis, and subsequent generator of local acid

inflammation in tissues, it might be reasonable to assume that larger areas of atelectasis might be linked to higher degrees of eosinophil infiltrates. However, further studies are needed to fully establish this correlation.

First measurement differences on respiratory rate that were found may be related to the fact that the OSG also had better pO₂ values; thus, it is reasonably fair to assume that initial higher mean respiratory rate in NOSG may be due to extra effort in compensating transient initial lower pO₂ (Figure 2). These facts were expected, and the experiment evolution proved that these higher respiratory rates from NOSG increased the pO₂, a finding also confirmed (Figure 5).

Conclusions

Oxygen sustainably enhances eosinophil based acute inflammatory response in the rabbit lung parenchyma in spontaneous ventilation mode, this when compared to a normoxic spontaneous ventilated group.

The time variable does not seem to influence the occurrence of the more pronounced inflammatory response (moderate); the main factor that appears to have influence is the presence or absence of oxygen supplementation.

Competing interests

No financial or non-financial competing interests are relevant to any of the authors. Thus, all the authors have no competing interests of any kind regarding the publication of this study.

Authors' contributions

HM elaborated the study design, experimental laboratory work, the writing of manuscript and editing work. CN performed the statistical advising and calculations, participated in writing of manuscript and editing work. PS participated in the study design, writing and editing of the manuscript. AC participated in the study design and made histological observation of lung preparations. AS participated in the study design, editing and revision of manuscript. AA participated in the study design, laboratory work, editing and revision of manuscript. All authors read and have given final approval of the version to be published; in addition, all authors agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Authors' information

Our multidisciplinary research group has several medical doctors with different specialties, namely anesthesiology (HM and PS), intensive care/chest medicine (AS) and pathology (AC), a mathematician (CN), and a senior research director of university laboratory (AA).

Our research has a specially designed animal model and set up (rabbit - *Oryctolagus cuniculus*) for investigating oxygen influence on ventilation in several ventilation modes. Ventilation has been a special interest of some of the authors (HM, PS, and AS) due to their routine clinical activity in operating room and intensive care. Assuming the challenges of controlled ventilation, the authors decided to investigate some variables that may enhance its risk, namely oxygen inspired fraction. To avoid mechanical ventilation bias, a spontaneous ventilation model was developed to overcome this problem. Proficiency in histological observation was guaranteed by a pathologist (AC) with a devoted professional career to lung pathology. Other studies are being planned to research related issues.

Acknowledgements

The authors would like to thank Mr Costa e Silva for coordinating the housing and husbandry of animals and Mrs Manuela Silva for help in laboratory tasks, Dr. Ana Pinto and Dr. Madalena Costa for histology

assembling and preparation, to Dr. António Marques as an English native speaking person that reviewed the manuscript. The authors would like to thank Centro Hospitalar do Porto for funding regarding the purchase of animals, animal food, and other husbandry expenses. No funding was used to reimburse any of the authors, nor any of the persons who helped and are herein thanked. Funding for open access publication was supported by the Anesthesia Department at Centro Hospitalar do Porto.

Author details

¹Serviço de Anestesiologia, Centro Hospitalar do Porto, Largo Abel Salazar, Porto 4099-001, Portugal. ²Departamento de Ciências e Tecnologia, Universidade Aberta, Rua da Escola Politécnica 141, Lisboa 1269-001, Portugal. ³Serviço de Anatomia Patológica, Centro Hospitalar Gaia/Espinho, Rua Conceição Fernandes, Vila Nova de Gaia 4430, Portugal. ⁴Serviço de Cuidados Intensivos, Centro Hospitalar do Porto, Largo Abel Salazar, Porto 4099-001, Portugal. ⁵Departamento de Anatomia Normal, Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade do Porto, Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228, Porto 4050-313, Portugal. ⁶Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica, Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228, Porto 4050-313, Portugal.

Received: 9 May 2014 Accepted: 25 September 2014

Published: 1 October 2014

References

- Hemmes SNT, Paulus F, Schultz MJ: **From the dark side of ventilation toward a brighter look at lungs.** *Crit Care Med* 2013, **41**:1296-1304.
- Hall NG, Liu Y, Hickman-Davis JM, Davis G, Myles C, Andrews EJ, Matalon S, Lang JD Jr: **Bactericidal function of alveolar macrophages in mechanically ventilated rabbits.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006, **34**:719-726.
- Hammerschmidt S, Kuhn H, Sack U, Schlenska A, Gessner C, Gillissen A, Wirtz H: **Mechanical stretch alters alveolar type II cell mediator release toward a proinflammatory pattern.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005, **33**:203-210.
- Kilpatrick B, Slinger P: **Lung protective strategies in anaesthesia.** *Br J Anaesth* 2010, **105**:108-116.
- Guarracino F, Baldassar R: **Perioperative acute lung injury: reviewing the role of anesthetic management.** *J Anesth Clinical Res* 2012, **4**:312.
- Schilling T, Kozian A, Huth C, Buhling F, Kretzschmar M, Welte T, Hachenberg T: **The pulmonary immune effects of mechanical ventilation in patients undergoing thoracic surgery.** *Anesth Analg* 2005, **101**:957-965.
- De Conno E, Steurer MP, Wittlinger M, Zalunardo MP, Weder W, Schneider D, Schimmer RC, Klaghofer R, Neff TA, Schmid ER, Spahn DR, Z'graggen BR, Urner M, Beck-Schimmer B: **Anesthetic-induced improvement of the inflammatory response to one-lung ventilation.** *Anesthesiology* 2009, **110**:1316-1326.
- Britt RD Jr, Velten M, Tipple TE, Nelin LD, Rogers LK: **Cyclooxygenase-2 in newborn hyperoxic lung injury.** *Free Radic Biol Med* 2013, **25**:502-511.
- Iliodromiti Z, Zygouris D, Sifakis S, Pappa KI, Tsikouras P, Salakos N, Daniilidis A, Siristatidis C, Vrachnis N: **Acute lung injury in preterm fetuses and neonates: mechanisms and molecular pathways.** *J Matern Fetal Neonatal Med* 2013, **26**:1696-1704.
- Yamada M, Kubo H, Kobayashi S, Ishizawa K, Sasaki H: **Interferon-G: a key contributor to hyperoxia-induced lung injury in mice.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, **287**:L1042-L1047.
- Nowak-Machen M, Schmelzle M, Hanidziar D, Junger W, Exley M, Otterbein L, Wu Y, Csizmadia E, Doherty G, Sitkovsky M, Robson SC: **Pulmonary NKT cells play an essential role in mediating hyperoxic acute lung injury.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013, **48**:601-609.
- Waisman D, Brod V, Rahat MA, Amit-Cohen B, Lahat N, Rimar D, Menn-Josephy H, David M, Lavon O, Cavari Y, Bitterman H: **Dose related effects of hyperoxia on the lung inflammatory response in septic rats.** *Shock* 2012, **37**:95-102.
- Rogers LK, Tipple TE, Nelin LD, Welty SE: **Differential responses in the lungs of the new-born mouse pups exposed to 85% or >95% oxygen.** *Pediatr Res* 2009, **65**:33-38.
- Eltzschig HK, Carmeliet P: **Hypoxia and inflammation.** *N Engl J Med* 2011, **364**:656-665.
- Lamagna C, Scapini P, A. van Ziffle J, DeFranco AL, Lowell CA: **Hyperactivated MyD88 signaling in dendritic cells, through specific deletion of Lyn kinase, causes severe autoimmunity and inflammation.** *PNAS* 2013, **110**:E3311-E3320. Supporting information www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1300617110/-DCSupplemental.
- Mead R: *The Design of Experiments.* 1st edition. Cambridge, New York: Cambridge University Press; 1988:620.
- Lee PJ, Alam J, Sylvester W, Inamdar N, Otterbein L, Choi AMK: **Regulation of heme oxygenase-1 expression in vivo and in vitro in hyperoxic lung injury.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996, **14**:556-568.
- Horinouchi H, Wang CC, Shepherd KE, Jones R: **TNF gene and protein expression in alveolar macrophages in acute and chronic hyperoxia-induced lung injury.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996, **14**:548-555.
- Suzuki Y, Nishio N, Takeshita K, Takeuchi O, Watanabe K, Sato N, Naoki K, Kudo H, Aoki T, Yamaguchi K: **Effect of steroid on hyperoxia-induced ICAM-1 expression in pulmonary endothelial cells.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000, **278**:L245-L252.
- Quin DA, Moufarrej RK, Volokhov A, Hales CA: **Interactions of lung stretch, hyperoxia, and MIP-2 production in ventilator-induced lung injury.** *J Appl Physiol* 2002, **93**:517-525.
- Wilson MR, O'Dea KP, Zhang D, Shearman AD, Van Rooijen N, Takata M: **Role of lung-margined monocytes in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury.** *Am J Respir Crit Care Med* 2009, **179**:914-922.
- Haase VH, Colgan SP, Karhausen J: **Inflammatory hypoxia.** *Cell Cycle* 2005, **4**:256-268.
- Gleich GJ: **Mechanisms of eosinophil-associated inflammation.** *J Allergy Clin Immunol* 2000, **105**:651-663.
- Nissim Ben Efraim AH, Eliashar R, Levi-Schaffer F: **Hypoxia modulates human eosinophil function.** *Clin Mol Allergy* 2010, **19**: 8:10.
- Kopterides P, Kapetanakis T, Siempos II, Magkou C, Pelekanou A, Tsaganos T, Giamarellos-Bourboulis E, Roussos C, Armaganidis A: **Short-term administration of a high oxygen concentration is not injurious in an ex-vivo rabbit model of ventilator-induced lung injury.** *Anesth Analg* 2009, **108**:556-564.

doi:10.1186/1471-2253-14-86

Cite this article as: Machado et al.: Increased lung inflammation with oxygen supplementation in tracheotomized spontaneously breathing rabbits: an experimental prospective randomized study. *BMC Anesthesiology* 2014 **14**:86.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



4.2.5 Série 3

Todos os animais nesta série de estudo apresentaram critérios de bem-estar durante a sua permanência no biotério, com normal horário e hábito de alimentação e hidratação; não se verificou a existência de automutilação ou perda de peso, tendo as visitas diárias dos investigadores tido resultados considerados normais. A mediana do peso dos animais desta série cifrou-se nos 2209 gramas (1540-2670; desvio padrão 241,4g).

A tabela 5 apresenta a evolução dos parâmetros monitorizados ao longo do estudo experimental, com a frequência respiratória (A), frequência cardíaca (B), saturação arterial de oxigénio (C) e temperatura retal (D).

Tabela 5 - Evolução dos parâmetros fisiológicos monitorizados na série 3

A - Frequência Respiratória – Série 3				
Coelho	1ª medição	2ª medição	3ª medição	4ª medição
1	74	80	84	78
2	72	70	64	68
3	88	80	80	76
4	96	88	82	85
5	92	94	90	86
6	92	100	92	96
7	82	84	82	82
8	64	64	64	68
9	74	74	82	80
10	58	61	64	62
11	100	90	90	88
12	104	96	100	98
13	108	108	104	104
14	71	70	72	74
15	110	98	100	102
16	118	120	112	110
17	102	102	100	102
18	102	106	110	112
19	94	98	92	96
20	112	128	148	142

B - Frequência Cardíaca – Série 3				
Coelho	1ª medição	2ª medição	3ª medição	4ª medição
1	220	167	189	201
2	221	175	184	178
3	193	190	194	198
4	230	168	166	161
5	210	178	185	198
6	210	186	188	189
7	212	207	198	198
8	211	214	203	204
9	180	180	186	186
10	170	161	178	180
11	160	152	166	172
12	206	196	185	183
13	150	151	181	191
14	190	181	179	177
15	181	178	190	194
16	155	179	228	237
17	183	191	194	193
18	183	185	198	196
19	185	195	200	191
20	198	199	218	200

C - Saturação arterial de O ₂ – Série 3				
Coelho	1ª medição	2ª medição	3ª medição	4ª medição
1	100	87	88	96
2	93	100	100	99
3	93	94	98	98
4	85	99	99	99
5	88	96	96	99
6	98	96	99	99
7	100	98	98	99
8	92	98	99	100
9	92	88	93	94
10	91	96	94	95
11	90	95	95	97
12	83	92	95	95
13	82	89	92	98
14	82	79	86	90
15	82	93	100	94
16	87	88	89	90
17	89	93	96	96
18	92	98	96	98
19	80	85	87	92
20	89	92	96	98

D - Temperatura – Série 3				
Coelho	1ª medição	2ª medição	3ª medição	4ª medição
1	38	37	36,5	36
2	38	37	36,8	36
3	38	37	36,6	36
4	38	37	36,5	36
5	38	37	36	35,5
6	38	37	36,5	36
7	38	37	36,6	36
8	38	37	36	36
9	38	37,6	37,2	37
10	38	37	36,5	36
11	38	37	36,5	36
12	38	37,5	37,5	37
13	38	37,5	37,5	37
14	38	37,2	36,5	36
15	39	38	37,2	37
16	38	37	36,4	36
17	38	37,1	36,8	36
18	38	38	38	38
19	40	39	38	37
20	39	38,5	38	37

A mediana e o intervalo dos valores da monitorização não invasiva são mostrados na tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros de monitorização não invasiva nos grupos OSG e NOSG de VMP, com e sem suplementação de oxigénio, respetivamente – Série 3

	Ventilação Monopulmonar (VMP)			
	OSG (Suplementação com oxigénio)		NOS (Sem suplementação com oxigénio)	
	<i>1º Registo</i>	<i>Último registo</i>	<i>1º Registo</i>	<i>Último registo</i>
A - Frequência Respiratória, ciclos/min.	78 (58-96)	79 (62-96)	103 (71-118)	102 (74-142)
B - Frequência cardíaca, batimentos/ min.	211.5 (170-230)	187.5 (161-204)	183 (150-206)	192 (172-237)
C - Saturação arterial periférica de oxigénio, SpO2	92.5 (85-100)	99 (94-100)	85 (80-92)	95.5 (90-98)
D- Temperatura °C	38 (38-38)	36 (35.5-37)	38 (38-40)	37 (36-38)

Os primeiros valores de frequência cardíaca, frequência respiratória e saturação arterial periférica foram estatisticamente diferentes entre os dois grupos ($p < 0,05$), excetuando-se a temperatura.

Durante o procedimento a SpO_2 aumentou significativamente em ambos os grupos ($p < 0,05$) em cerca de 12,4%.

A temperatura diminuiu com significado estatístico nos dois grupos ($p < 0,05$) em 2,6%.

A frequência cardíaca apenas aumentou com significado estatístico no grupo NOSH, em cerca de 4,9% ($p < 0,05$).

A tabela 7 mostra os valores dos gases de sangue arterial dos animais estudados na série 3.

Tabela 7 – Gases de sangue arterial dos animais estudados na série 3. Amostra A – inicial, Amostra B – final. pH – pH do sangue arterial, $p\text{CO}_2$ – pressão parcial de dióxido de carbono arterial, $p\text{O}_2$ – pressão parcial de oxigênio arterial, HCO_3 – concentração arterial de bicarbonato, SatO_2 – saturação arterial de oxigênio

COELHO	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5
Amostra	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
pH	7,355	7,336	7,43	7,388	7,456	7,347	7,343	7,343	7,392	7,296
PCo2	61,8	46,6	57,8	55,9	59,6	66,7	53,5	54	47	53,6
PO2	342	318	108	253	62,1	217	92,3	405	285	356
HCO3	34,5	24,9	36,5	33,6	40,3	36,6	29	29,3	28,6	26,1
Sat O2	99	99	99,2	100	97,9	99	99	99	99	99

COELHO	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10
Amostra	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
pH	7,344	7,386	7,388	7,449	7,37	7,397	7,414	7,429	7,273	7,362
PCo2	49,8	49,6	53,7	47	63,7	52,4	53,4	41,8	69,2	50,7
PO2	368	404	151	394	93	168	161	347	167	309
HCO3	25,5	28,2	32,4	32,5	36,8	32,2	34,2	27,6	31,9	28,7
Sat O2	100	100	99	99	99	99	99	99	99	99

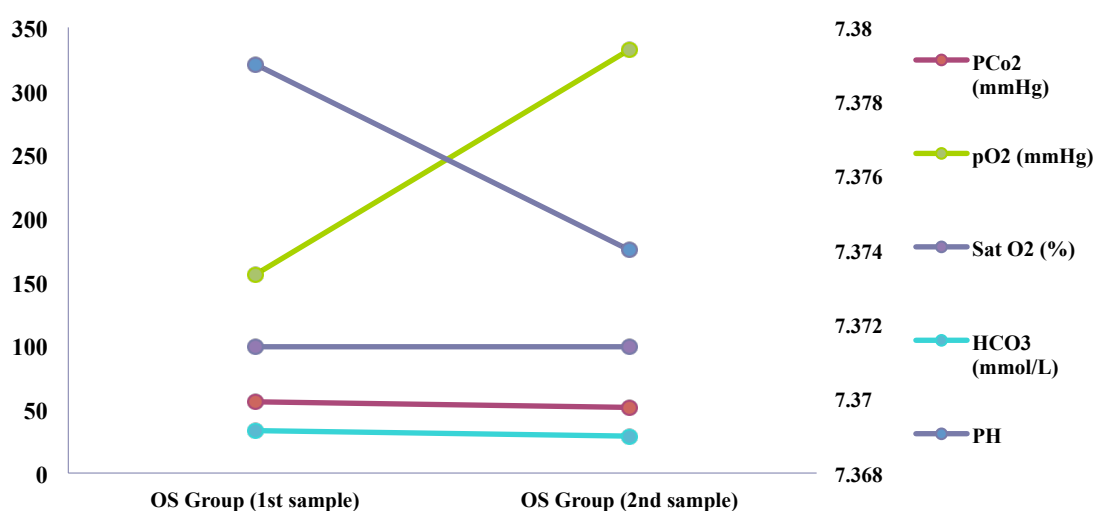
COELHO	11	11	12	12	13	13	14	14	15	15
Amostra	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
pH	7,358	7,456	7,354	7,386	7,387	7,41	7,413	7,46	7,404	7,351
PCo2	62,3	39,3	61,4	54,1	51,2	41,8	61,8	50,5	54	49
PO2	27,5	101	54,6	69,8	49,3	84,5	43,7	81,7	57,8	77,7
HCO3	35	27,7	31,1	30,4	28,9	26,5	39,4	35,8	31,9	27,1
Sat O2	45,2	99	89,1	100	86,7	99	81,3	99	95,9	99

COELHO	16	16	17	17	18	18	19	19	20	20
Amostra	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
pH	7,328	7,338	7,353	7,322	7,402	7,467	7,304	7,351	7,443	7,379
PCo2	68,3	53,8	62,8	53,4	51,9	38,6	58,8	45,4	46,3	31,8
PO2	41,6	60,6	41,9	61,9	55,9	84	51,1	84,1	62,9	93,6
HCO3	31,1	26,4	31,5	25,4	30,3	27,9	26	25,1	30,4	19,6
Sat O2	70,7	94,5	81,4	94,9	92,7	99	84,4	99	91,4	98,2

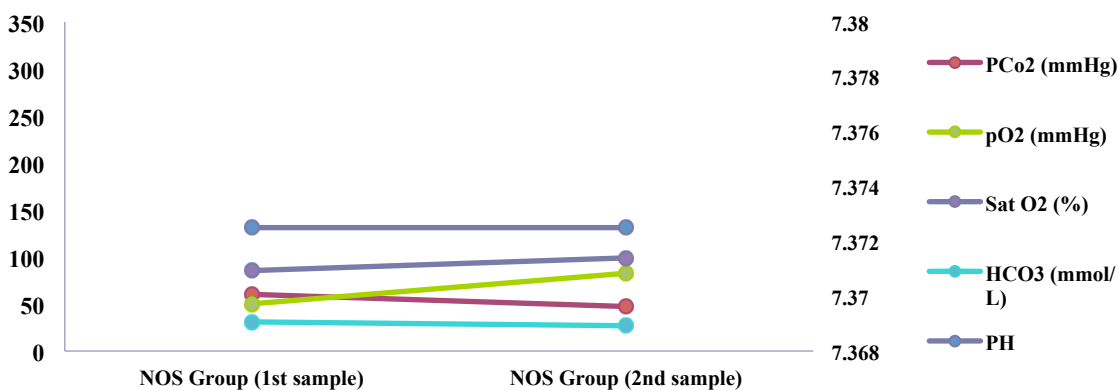
A figura 10 mostra os resultados obtidos da evolução dos gases de sangue arterial no início e final do procedimento (mediana) série 3.

Figura 10. Gases sangue arterial, primeira e última colheita, A – grupo 1 com suplementação de oxigénio, e B – grupo 2 – sem suplementação de oxigénio. pO_2 – pressão parcial de oxigénio arterial, PCO_2 – pressão parcial de dióxido de carbono arterial, HCO_3 – concentração de bicarbonato arterial, pH – pH do sangue arterial

A – grupo 1 com suplementação de oxigénio



B – grupo 2 – sem suplementação de oxigénio.



A pressão parcial de oxigénio arterial (pO_2) e a saturação arterial de oxigénio ($SatO_2$) foram estatisticamente diferentes ($p<0,001$) na primeira amostra.

No final do procedimento a mediana da pO_2 aumentou 116% no grupo com suplementação de oxigénio (OSG) e 65% no grupo sem suplementação, esta diferença foi estatisticamente significativa ($p<0,001$).

A $SatO_2$ não se modificou entre as duas colheitas no grupo OSG, mas aumentou significativamente em 15,75% no grupo NOSG.

Não se observaram diferenças significativas entre grupos, nem entre as colheitas, relativamente aos parâmetros pH e bicarbonato.

Resultados histológicos

Em todas as amostras se observou algum grau de inflamação pulmonar (tabela 8)

Tabela 8. Inflamação presente nos grupos OSG e NOSG, em ventilação monopulmonar, com e sem suplementação de oxigénio.

	Ventilação Monopulmonar		
	Resposta inflamatória moderada (nº de lâminas)	Resposta inflamatória ligeira (nº de lâminas)	Total de lâminas
Grupo OSG - coelhos n=10 (com suplemento de oxigénio)	12	68	80
Grupo NOSG - coelhos n=10 (sem suplemento de oxigénio)	6	74	80
Total	18	142	160

Nesta terceira série, procedeu-se à análise de 8 lâminas para cada animal, uma vez que, existindo já um fator pro-inflamatório envolvido (VMP), e tendo sido colocada a hipótese de que a suplementação com oxigénio não interferiria com a resposta inflamatória, pretendeu-se quantificar este resposta mais aprofundadamente em cada animal.

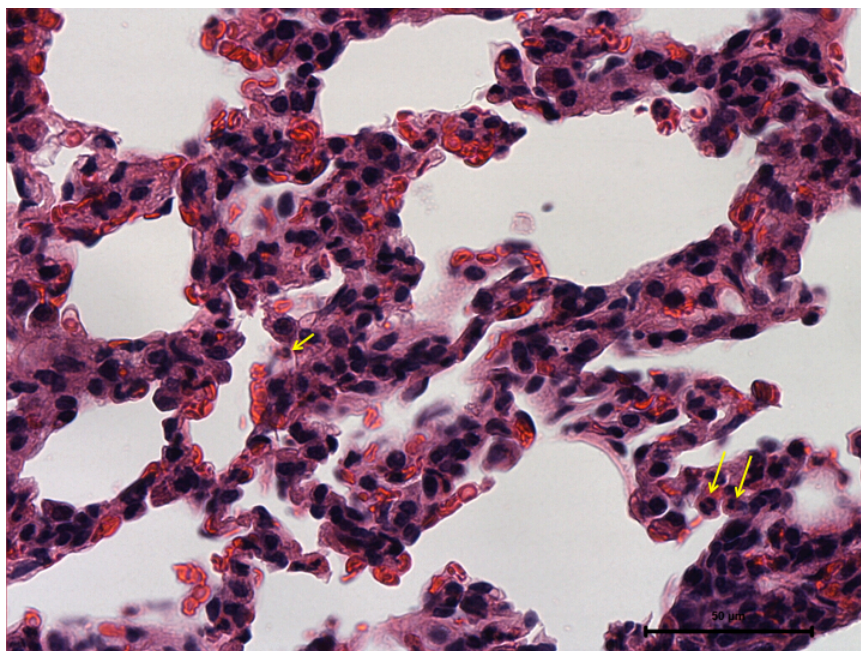
Assim, o grupo OSG apresentou inflamação moderada em 12 das 80 lâminas analisadas, enquanto que o grupo NOSG apenas apresentou 6; deste modo, a hipótese de estudo, que admitia que a ocorrência de inflamação e sua intensidade eram independentes da suplementação com oxigénio foi rejeitada (Chi-quadrado $p < 0,001$).

Não se encontraram diferenças entre a resposta inflamatória quando comparados o pulmão direito (deixado a ventilar durante o procedimento) e o pulmão esquerdo (excluído no âmbito do procedimento efetuado).

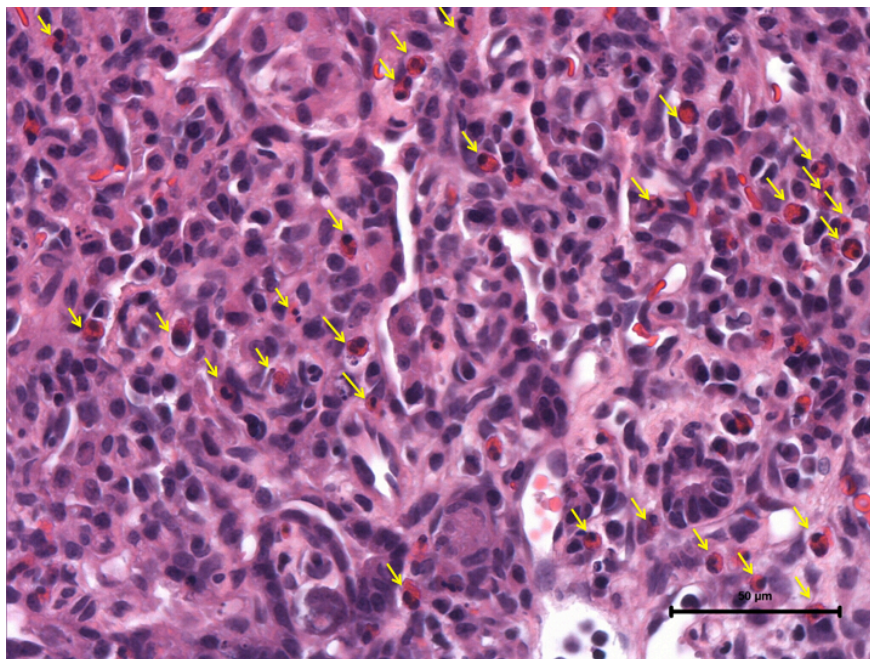
As células inflamatórias encontradas foram polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, numa proporção idêntica às séries anteriores, 25% para 75%, respetivamente (figura 11).

Figura 11. Inflamação pulmonar. A - ligeira e B - moderada. Setas – polimorfonucleares eosinófilos – Série 3

A



B



4.2.6 Manuscrito aceite para publicação com os resultados da série 3 (Journal of Anesthesia and Clinical Research)

1 **Oxygen increases lung inflammatory response in spontaneous one-lung ventilation**
2 **in rabbits: a prospective randomized experimental study.**

3 **Humberto S Machado (M.D., MSc.)** hjs.machado@gmail.com

4 Serviço de Anestesiologia, Centro Hospitalar do Porto

5 Address: Largo Abel Salazar, 4099-001 Porto, Portugal

6 **Catarina S Nunes (Lic, PhD)** CatarinaS.nunes@uab.pt

7 Universidade Aberta, Dep. Ciências e Tecnologia & Serviço de Anestesiologia, Centro

8 Hospitalar do Porto

9 Address: Largo Abel Salazar, 4099-001 Porto, Portugal

10 **Paula Sá (M.D., M.Sc.)** paulalexsa@gmail.com

11 Serviço de Anestesiologia, Centro Hospitalar do Porto

12 Address: Largo Abel Salazar, 4099-001 Porto, Portugal

13 **António Couceiro (M.D.)** acouceiro49@gmail.com

14 Serviço de Anatomia Patológica, Centro Hospitalar Gaia/Espinho

15 Address: Rua Conceição Fernandes, 4430 Vila Nova de Gaia, Portugal

16 **Álvaro Moreira da Silva (M.D., PhD)** amoreirasilva@ers.pt

17 Serviço Cuidados Intensivos, Centro Hospitalar Porto

18 Address: Largo Abel Salazar, 4099-001 Porto, Portugal

19 **Artur Águas (M.D., PhD)** aguas@icbas.up.pt

20 Departamento de Anatomia Normal, Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar - Universidade
21 do Porto & Unidade Multidisciplinar de Investigação Biomédica

22 Address: Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal

23 **Corresponding Author:**

24 **Humberto S Machado** M.D., M.Sc. hjs.machado@gmail.com

25 (Phone +351.935848475 fax+351.220900644)

26 Serviço de Anestesiologia - Centro Hospitalar do Porto - Largo Professor Abel Salazar, 4099-
27 001 Porto, Portugal

28

29 **Abstract**

30 **Study objective:** The purpose of this study was to investigate if oxygen
31 supplementation would increase lung inflammatory response in a spontaneous one-lung
32 ventilation animal model, when compared to room-air oxygen fraction.

33 **Design:** In vivo prospective randomized animal study

34 **Setting:** University research laboratory

35 **Subjects:** New Zealand rabbits

36 **Interventions:** Rabbits (n=20) were randomly assigned to 2 groups (n=10 each group).
37 Groups (OS – oxygen supplemented, and NOS – non-oxygen supplemented) were
38 submitted to spontaneous one-lung ventilation (OLV) during 60 minutes; OS group had
39 a 2-liter/minute oxygen supplement, and NOS group was kept on room-air.

40 Ketamine/xylazine was administered for induction and maintenance of anesthesia. One-
41 lung ventilation was achieved by administration of air into interpleural space, and left
42 lung collapse was visually confirmed through the center of diaphragm. Clinical
43 monitoring and arterial blood gas analyses were performed in all rabbits.

44 **Measurements:** Lung histology plates were observed under light microscopy for
45 quantification of inflammatory response (light, moderate and severe)

46 **Main results:** All subjects had at least light inflammatory response. However, rabbits
47 submitted to oxygen supplementation had a statistically significant value for the
48 occurrence of moderate inflammation ($p<0.001$). The inflammatory cells found were
49 mainly eosinophils and neutrophils in an average proportion of 80/20. Oxygen partial
50 pressure increased in both groups with a higher proportion in OS group ($p<0.001$).

51 **Conclusion:** In this spontaneous OLV model, the use of oxygen supplementation was
52 associated with a greater inflammatory response.

53

54 **Key words:** oxygen supplement, lung inflammatory response, spontaneous one-lung
55 ventilation

56 **Introduction**

57 The complex relations and interactions of volutrauma (overdistension),
58 barotrauma (increased pulmonary pressures), atelectotrauma (cyclic opening and
59 closing of alveoli) and biotrauma (inflammatory mediators) play an important role on
60 development of ventilator induced lung injury (VILI) [1][2]. Mechanical ventilation can
61 influence the extent and course of perioperative well-being [3] [4]. Even healthy
62 individuals when submitted to mechanical ventilation are prone to develop lung injuries
63 [5]. Recent studies suggest that even protective ventilatory strategies may induce
64 subclinical ventilation lung injury in previous healthy lungs, by initiation of subclinical
65 VILI, and possibly by sensitizing the lung to a second hit [4].

66 Using near physiological tidal volumes, approximately 6 ml/kg as standard
67 mammalian spontaneous tidal volumes strategy [6] [7], may imply some atelectasis
68 formation. This condition will be present due to local alveolar collapse, with a
69 subsequent formation of shunt and hypoxia. Moreover, an augmented inspired oxygen
70 fraction will commonly be used to mitigate this condition, which will generate
71 hyperoxia in aerated lung. Hypoxia can generate inflammation [8] and hyperoxia can
72 worsen atelectasis and lead to excess of reactive oxygen species, all worsening acute
73 lung injury (ALI) [9][10][6].

74 In the one-lung ventilation (OLV) situations, tidal volumes < 6 ml/kg, positive
75 end-expiratory pressure (PEEP) between 5 and 10 cm H₂O, and the lowest possible
76 oxygen inspired fraction (FiO₂) to maintain peripheral oxygen arterial saturation over
77 90 %, are the main features for a protective ventilatory strategy [11]. The lowest FiO₂
78 possible to provide adequate peripheral saturation has been accepted as the best option
79 to reduce oxidative damage and to prevent absorption atelectasis [12] [13] [11].
80 Nevertheless, spontaneous OLV, on its own, has been observed as a condition in which

81 inflammation is more present when compared to a spontaneous two-lung ventilation
82 mode [14].

83 The objective of this study was to evaluate the contribution of oxygen
84 supplementation to the occurrence of acute inflammatory response in both lungs, in an
85 OLV model using a spontaneous breathing mode. In this regard, the study hypothesis is
86 that oxygen will not influence the occurrence of inflammation in this model, since OLV
87 is present, but no controlled ventilation is applied.

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106 **Methods**

107 *2.1. Animals*

108 The experimental protocol used in this study was approved by appropriate local
109 ethic committee (“Comité de Ética do ICBAS/UP”), and was done according to the European
110 Union Directive nº 63/2010/EU. Twenty adult New Zealand rabbits were purchased from a
111 Portuguese breeder (NORLAP – Rui M.S. Gonçalo, 4825-466 Águas-Longo, Portugal)
112 and kept under standard housing conditions with unrestricted access to food and water,
113 with attendance by veterinary doctors and daily inspection. Study inclusion criteria for
114 rabbits were based on general well being status, namely normal food and water
115 ingestion, with absence of self-mutilation and weight loss.

116 *2.2. Study groups*

117 This study was conducted as a prospective randomized animal experiment; two
118 groups were studied, with 10 rabbits each, on spontaneous one-lung ventilation. Group
119 1 had oxygen supplementation (OS) with a fresh gas flow mixture on air of 2
120 liters/minute with a Jackson-Rees system; Group 2 had no oxygen supplementation
121 (NOS) to the breathing system. Both groups had a 60-minute length of procedure.

122 *2.3. Instrumentation*

123 The rabbits were anesthetized with intramuscular ketamine 50 mg/kg
124 (Imalgene®, Merial Laboratorios, S.A., Spain) and xylazine 4 mg/kg (Rompum®,
125 Bayer, Leverkusen, Germany). Anesthesia maintenance was attained with half the initial
126 dose of ketamine and xylazine every 20 minutes. The anterior region of the neck and the
127 abdomen were shaved, and a 2 cm vertical midline incision being made through the
128 anterior cervical region; after exposing the trachea, an incision was made to allow the
129 introduction of a 2.5 tracheal tube to be connected to a spontaneous breathing system
130 (Jackson-Rees type). In all rabbits, a 4 cm vertical abdominal incision was performed

131 in order to allow aortic blood samples collection and visualization of the left inferior
132 face of the diaphragm; once the diaphragm was visualized 10 milliliters of air was
133 administered thru its left half. Immediately after this, left lung recoil was observed thru
134 the medial tendinous center of the diaphragm. This fact was consistently confirmed in
135 all rabbits, by direct visualization, which also allowed a visualization of the spontaneous
136 and normal ventilation of the right lung [14]. At the end of procedure all rabbits were
137 euthanized with ketamine (100mg/kg) and xylazine (8 mg/kg), followed by section of
138 abdominal aorta for exsanguination.

139 2.4. Monitoring

140 During the procedure non-invasive monitoring was used to monitor *heart rate*
141 (HR) and *oxygen peripheral arterial saturation* (SpO₂) (Nellcor Oximax N600X®, Tyco
142 Healthcare group LP, Nellcor Puritan Bennett Division, Pleasanton, CA 94588, USA);
143 *respiratory rate* (RR) was monitored by direct observation. Measurements were
144 obtained immediately after setup and every 15 minutes.

145 Blood samples were obtained directly from aortic puncture, five minutes after
146 set up and immediately before the end of procedure, and analyzed for arterial oxygen
147 (PaO₂) and carbon dioxide (PaCO₂) partial pressures, *pH*, Bicarbonate (HCO₃⁻) and
148 peripheral arterial saturation with oxygen (SatO₂) (Radiometer ABL 90flex®,
149 Radiometer medical APS, akandevej 21, 2700 Bronshøj, Denmark).

150 2.5. Tissue samples

151 The rabbits' lungs were harvested and fixed in 10% formaldehyde and
152 embedded in paraffin for a light microscopy (LM) study. Three micra sections
153 from the left and right lungs (superior, dorsal medial, ventral medial and lower
154 aspects respectively) were obtained from all rabbits. Lung sections were stained
155 in haematoxylin and eosin. A total of 8 plates were collected for each rabbit.

156 2.6. Histopathology

157 An arbitrarily defined four level inflammatory score was assigned to the lungs
158 depending on the intensity of inflammatory infiltrates in each lung plate: no
159 inflammation, light, moderate and severe inflammation.

160 Infrequent inflammatory cells and/or inflammation confined to a few areas
161 (corresponding to less than 15 cells per high magnification field of 40x) [15] were
162 defined as a **light** inflammatory response. Multiple areas in the tissue or a large area of
163 inflammatory cells (corresponding to an average of 16 to 25 cells per high
164 magnification field 40x) [15] were defined as a **moderate** inflammatory response. Large
165 multifocal areas of tissue with inflammatory cells or almost all areas of tissue affected
166 (corresponding to more than 25 cells per high magnification field 40x) [15] were
167 defined as **severe** inflammation. Thus, plates were classified as light, moderate or
168 severe inflammatory responders according to the intensity of inflammation assessed.

169 Staff investigators who collected data during the procedure were aware of the
170 group assignments. An independent and experienced pathologist (unaware of which
171 subject was being evaluated) classified all plates accordingly to the criteria set.
172 The plates were classified as light, moderate or severe inflammatory responders,
173 according to the intensity of inflammation encountered

174 2.7. Statistical Analysis

175 The Resource Equation method [16] was used to determine if the sample size
176 was appropriate for the experiment, considering a laboratory animal study with a
177 controlled set-up. A sample size of 10 rabbits per group with a total of 2 groups (n=20)
178 were considered adequate for the questions being asked, resulting in an adequate error
179 component (df) between 10 and 20. Kruskal-Wallis non-parametric test was used to
180 compare variables between groups. Friedman test (Nonparametric two-way ANOVA)

181 was used to compare variations within groups. Pearson's chi squared test was used to
182 test for independence in inflammation. The statistical hypothesis is that the occurrence
183 of moderate inflammation is independent of the technique (OS or NOS); the results
184 presented by Machado et al [14] were considered for the effect of OLV, to estimate the
185 expected proportion of plates with moderate inflammation. A p-value<0.05 was
186 considered statically significant. The IBM SPSS ® 21 and Microsoft Excel 2013 were
187 used for all calculations. Data is presented with median and range variables.

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

Results

The results founded were accepted as valid, and only light or moderate inflammatory patterns were found. No severe inflammatory response was seen in any of the groups.

The median rabbit weight was 2209 g (1540-2670; Standard Deviation [SD] 241,4), the rabbits were randomly assigned to each group.

The median values and range of non-invasive monitored parameters are shown in table 1. The first recorded values of HR, RR and SpO₂ were statistically different between Group 1 and Group 2 ($p<0.05$). The initial rectal temperature is not statistically different between groups. During the procedure SpO₂ significantly increased in both groups ($p<0.05$) by 12.4%. Temperature also statistically decreased in both groups ($p<0.05$) by 2.6%. HR only increased in Group 2 by 4.9% ($p<0.05$).

Arterial blood gas values are shown in figure 1. The pO₂ and SatO₂ were different between groups ($p<0.001$) on first sample. At the end of the procedure the median pO₂ increased by 116% in Group 1, and by 65% in Group 2, this change was significantly different ($p<0.001$). Sat O₂ did not change (between first and final samples) for Group 1, but it increased significantly by 15.7% in Group 2. No significant differences were observed either within the groups or between groups regarding initial and final measurements of pH, and Bicarbonate.

All plates had some degree of inflammation (Table 3). The oxygen supplemented (OS) Group showed moderate inflammation in 12 out of 80 plates, whereas the non-oxygen supplemented (NOS) Group showed 6 plates; in this regard, the study hypothesis, that postulated that the occurrence of moderate inflammation was independent of oxygen supplementation, was rejected (Chi-square $p<0.001$). No differences were observed between inflammatory response in left and right lungs

231 (respectively, collapsed and ventilated) within groups. The inflammatory cells found in
232 these histological plates were neutrophils and eosinophils; with a proportion of about
233 75% eosinophils and 25% neutrophils.

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256 **Discussion**

257 Both groups exhibit some degree of inflammation, evidenced by the appearance
258 of at least mild inflammation in all subjects. This fact confirms the tendency of OLV is
259 prone to the occurrence of acute lung injury in spontaneous breathing subjects [14],
260 reinforced by evidence that near physiologic tidal volumes may also be somehow
261 harmful [17].

262 The occurrence of more pronounced inflammatory response on those animals
263 supplemented with oxygen when compared to those on room air ventilation ($p < 0,001$),
264 confirms that a certain degree of oxygen content might induce an enhanced population
265 of acute inflammatory cells. Hyperoxia itself might induce atelectasis formation and
266 diminish the aerated areas of the lung [4], inducing the occurrence of non ventilated
267 areas that are prone to generate local hypoxia and acidic environments.

268 In this study it is possible to observe a higher mean oxygen partial pressure
269 (PaO_2) in the OS group, as expected. These higher quantities of oxygen might be
270 responsible for a greater inflammatory response on this group, on top of the effect seen
271 after atelectasis formed by the left lung collapse. Inflammatory mechanisms are
272 enhanced by local tissue hypoxia [18], and the superimposed oxygen exposure itself,
273 would trigger reactive oxygen intermediates (ROI) formation and the induction of
274 further mechanisms of inflammatory cellular response [13].

275 Our study confirms that the use of physiological tidal volumes and room-air
276 oxygen inspired fraction, may reduce the possibility of the occurrence of significant
277 acute inflammatory response; especially in the cases in which one-lung ventilation is
278 used.

279 Our results, either in mild or moderate inflammatory plates, as expected, the
280 acute inflammatory infiltrate is composed of polymorphonuclear leucocytes, however,

281 more than 75% of the cells found are eosinophils. Existing evidence shows that there is
282 an important link between hypoxia and eosinophil function [19]; hypoxic stress induces
283 the transcription of several factors, like the hypoxia inducible factor (HIF-1),
284 responsible for oxygen homeostasis [20][21], and changes in eosinophil cellular profile
285 enhancing its ability to migrate thru blood vessels, decreasing cellular apoptosis, and
286 prolonging its half-life [22] [23][19].

287 First measurements of RR, SpO2 and HR were significantly different between
288 groups ($p < 0.05$), but this is expected since the first measurement was done after the
289 setup was ready, meaning Group 1 already had oxygen supplementation. This fact
290 might explain the lower RR in the OS group, because of a lesser need to compensate
291 hypoxia; likewise the higher SpO2 was expected in the OS group, nevertheless it raise
292 from the first to last measurement in both groups. Temperature decrease in both groups
293 mainly because passive cooling was present but with no clinical significance. The
294 higher HR observed in the NOS group (4,9%, $p < 0.05$) might be linked to a higher
295 hypoxic representation.

296

297 Median pO2 value is higher in the OS group; this fact supports the higher
298 median respiratory rate of NOS Group, as mentioned above. NOS group oxygenation
299 was consistently sub-normal, since only room air was used for ventilation, and this is
300 confirmed by the lower pO2 values. Median pO2 increased in both groups, but in a
301 greater extent in OS group ($p < 0.001$), which was expected since oxygen
302 supplementation allowed a greater rise than a room-air oxygen fraction used in NOS
303 group. NOS Group had a significantly increase of Sat O2, by 15.7%, this fact might be
304 explained by the effort for normalization of the rather initial systemic hypoxic
305 conditions; nevertheless, the observed lower inflammation response in this group

306 confirms that oxygen supplementation might not be an adequate solution of this
307 problem since it might improve oxygenation but aggravated local conditions, and
308 induce more pronounced inflammatory response.

309 These data point out that a highly oxygenated group (when compared to a rather
310 hypoxic one) exhibited a more pronounced acute inflammatory response in an OLV
311 spontaneous ventilation model; in accordance to the available evidence. Moreover, since
312 no controlled ventilation has been used, it is fare to assume that these results confirm
313 that what is known about oxygen, regarding controlled ventilation, also applies to
314 spontaneous ventilation.

315 At harvesting the lungs, the left lung was consistently collapsed and the right
316 lung aerated, and both were untouched by any means, leaving them as their stood at the
317 time of animal euthanasia. This methodology was used exactly to avoid any possible
318 bias that might occur due to the use of a ventilator or organ manipulation.

319 Mechanotransduction is the involved mechanism that transforms extreme physical lung
320 forces into cellular signaling that induces polymorphonuclear leucocyte (PMN-L)
321 recruitment, activation and apoptosis/necrosis balance [4]. These cells play a major role
322 when activated by inflammatory mediators, which can be released without evidence of
323 tissue damage; this phenomenon has been named as loss of compartmentalization [4],
324 and its major consequence is the overall spillage of inflammatory mediators (biotrauma)
325 not only locally but also systemically, aggravating eventual ongoing ALI but also
326 having consequences in distal organs [4].

327 Since the inflammatory response impact is bilaterally present [24] [25], a
328 systemic explanation is may be involved in this process, which explains why moderate
329 inflammation plates were found in both lungs.

330

331 The main findings in this study include:

- 332 • In a spontaneous OLV, oxygen supplementation further increases the occurrence
333 of lung inflammation.
- 334 • In spontaneous OLV inflammation occurrence is of a bilateral nature, including
335 the ventilated and the non-ventilated lung
- 336 • Inflammation cellular type includes polymorphonuclear leucocytes neutrophils
337 and eosinophils, in an average of 20/80%, respectively.

338

339 The main conclusion of this study is that during procedures prone to the
340 development of acute lung injury, namely thoracic operations with one-lung ventilation,
341 or when safety margins are tight, common biotrauma triggers, as inspired oxygen
342 fraction, should be used with extreme caution, and thoroughly monitored; thus, oxygen
343 utilization in the operative setting should be confined to the lowest inspired fraction
344 possible, even in near physiologic tidal volumes in OLV situations.

345

346 Study limitations found during our work may be associated with the length of
347 the procedure, since a longer exposure might have enhanced the findings. Likewise, this
348 model is not similar to what is usually done in operating room for thoracic procedures;
349 thus, this model's characteristics might be of significance for its ability to avoid
350 interpretation bias (controlled ventilation, surgical manipulation), but, at same time
351 might raise some difficulties to be compared to the classical clinical setting. Further
352 studies to allow a closer resemblance to the common clinical approach may add value to
353 the overall comprehension of this issue.

354

355

356 **Acknowledgements**

357 The authors would like to thank Mr. Costa e Silva for coordinating the housing and
358 husbandry of animals, Mrs. Manuela Silva for help in laboratory tasks, and Dr. Ana
359 Pinto and Dr. Madalena Costa for histological assembling and preparation.

360 The authors would like to thank Centro Hospitalar do Porto for the funding granted for
361 the purchase of animals, animal food, and other husbandry expenses, as also the
362 Anesthesia Department at Centro Hospitalar do Porto for funding the edition and
363 publication of this study.

364

365 **Disclosures**

366 This study received funding from Centro Hospitalar do Porto (Largo Abel Salazar, 4099-001
367 Porto, Portugal) for logistic purposes, animal purchase, housing and husbandry. The
368 Anesthesia Department at Centro Hospitalar do Porto (Largo Abel Salazar, 4099-001 Porto,
369 Portugal) funded expenses regarding edition and publication. No funding was granted to
370 any author.

371

372

373

374

375

376

377

378

379

References

- [1] Lionetti V, Recchia F, Ranieri VM (2005) Overview of ventilator-induced lung injury mechanisms. *Curr. Opin. Crit. Care* 11: 82–86
- [2] Dos Santos CC, Slutsky S (2000) Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective. *J. Appl. Physiol* 89: 1645–1655
- [3] Futier E, Constantin JM, Paugam-Burtz C, Pascal J, Eurin M et al (2013) A trial of intraoperative low-tidal-volume ventilation in abdominal surgery. *N. Engl. J. Med* 369:428–437
- [4] Kilpatrick B, Slinger P (2010) Lung protective strategies in anaesthesia. *Br. J. Anaesth* 105: 108–116
- [5] Gajic MJ, Dara SI (2004) Ventilator-associated lung injury in patients without acute lung injury at the onset of mechanical ventilation. *Crit Care Med* 32: 2–3
- [6] Ricard JD, Dreyfuss D, Saumon G (2003) Ventilator-induced lung injury. *Eur Respir J* 22: Supplement 42, 2-9
- [7] Li LF, Yu L, Quinn DA (2004) Ventilation-induced neutrophil infiltration depends on c-Jun N-terminal kinase. *Am J Respir Crit Care Med* 169: 518–524
- [8] Koeppen M, Eckle T, Eltzschig HK (2011) The hypoxia-inflammation link and potential drug targets. *Curr Opin Anaesthesiol* 24:363–369
- [9] Jordan S, Mitchell J, Quinlan GJ, Goldstraw P, Evans TW (2000) The pathogenesis of lung injury following pulmonary resection. *Eur Respir J* 15:790–799
- [10] Quinn DA, Moufarrej RK, Volokhov A, Hales C (2002) Interactions of lung stretch, hyperoxia, and MIP-2 production in ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol* 93:517–525
- [11] Guarracino F, Baldassar R (2012) Perioperative Acute Lung Injury: Reviewing the Role of Anesthetic Management. *J Anesth Clin Res* 4:4
- [12] W. Karzai W, Schwarzkopf K (2009) Hypoxemia during One-lung Ventilation. *Anesthesiology* 6:1402–1411
- [13] Della Rocca G, Coccia C (2011) Ventilatory management of one-lung ventilation. *Minerva Anesthesiol* 77:534–536
- [14] Machado HS, Sa P, Nunes CS, Couceiro A, Da Silva AM et al (2014) Spontaneous one-lung ventilation increases the lung inflammatory response: an experimental pilot study. *J Anesth. Clin. Res* 5: 428

- 413 [15] Lamagna C, Scapini P, Van Ziffle AJ, DeFranco AL, Lowell C et al (2013)
 414 Hyperactivated MyD88 signaling in dendritic cells, through specific deletion of
 415 Lyn kinase, causes severe autoimmunity and inflammation. PNAS 110: E3311–
 416 E3320 Supporting information
 417 www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1300617110/-/DCSupplemental.
- 418 [16] Mead R (1988) The design of experiments. Statistical principles for practical
 419 application. Edn 1 Cambridge university press, cambridge, new york.
- 420 [17] Moriondo A, Pelosi P, Passi A, Viola M, Marcozzi C et al (2007) Proteoglycan
 421 fragmentation and respiratory mechanics in mechanically ventilated healthy rats.
 422 J Appl Physiol 103:747–756
- 423 [18] Eltzschig HK, Carmeliet P (2011) Hypoxia and inflammation. N Engl J Med
 424 364:656–665
- 425 [19] Nissim Ben Efraim AH, Eliashar R, Levi-Schaffer F (2010) Hypoxia modulates
 426 human eosinophil function. Clin. Mol. Allergy 8:10-18
- 427 [20] Murdoch C, Muthana M, Lewis CE (2005) Hypoxia Regulates Macrophage
 428 Functions in Inflammation. J Immunol 175: 6257–6263
- 429 [21] Cramer T, Johnson RS (2003) A Novel Role for the Hypoxia Inducible
 430 Transcription Factor HIF-1alfa: critical regulation of inflammatory cell function.
 431 Cell Cycle 2: 192–193
- 432 [22] Gleich GJ (2000) Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. J Allergy
 433 Clin Immunol 105:651–663
- 434 [23] Zhu X, Mose E, Zimmermann N (2013) Proton channel HVCN1 is required for
 435 effector functions of mouse eosinophils. BMC Immunol 14: 24
- 436 [24] Schilling T, Kozian A, Kretzschmar M, Huth C, Welte T et al (2007) Effects of
 437 propofol and desflurane anaesthesia on the alveolar inflammatory response to
 438 one-lung ventilation. Br. J. Anaesth 99: 368–375
- 439 [25] Sugawara Y, Yamaguchi K, Kumakura S, Murakami T, Kugimiya T et al (2011)
 440 The effect of one-lung ventilation upon pulmonary inflammatory responses
 441 during lung resection. J Anesth 25:170–177
- 442
- 443
- 444
- 445
- 446

447 **Table 1 – Physical parameters**

	OS Group (Oxygen supplemented)		NOS Group (Non-oxygen supplemented)	
	First Recording	Last Recording	First Recording	Last recording
RR, b/m	78(58-96)	79(62-96)	103(71-118)	102(74-142)
HR, bpm	211.5 (170-230)	187.5(161-204)	183(150-206)	192(172-237)
SpO2, %	92.5 (85-100)	99(94-100)	85(80-92)	95.5(90-98)
Temperature, °c	38 (38-38)	36(35.5-37)	38(38-40)	37(36-38)

448

449 In the first recording, RR, HR, and SpO2 were statistically different between groups
 450 ($p<0.01$). In the last recording RR, SpO2 and Temperature were statically different
 451 between groups ($p<0.05$). Between the 1st and last recording, SpO2 increased and the
 452 Temperature decreased significantly in both groups ($p<0.05$). HR increased only in
 453 Group 1 ($p<0.05$). Values are presented as mean (range). HR: heart rate; RR: respiratory
 454 rate; SpO2: peripheral oxygen arterial saturation; bpm: beats per minute; b/m: breaths
 455 per minute.

456

457

458

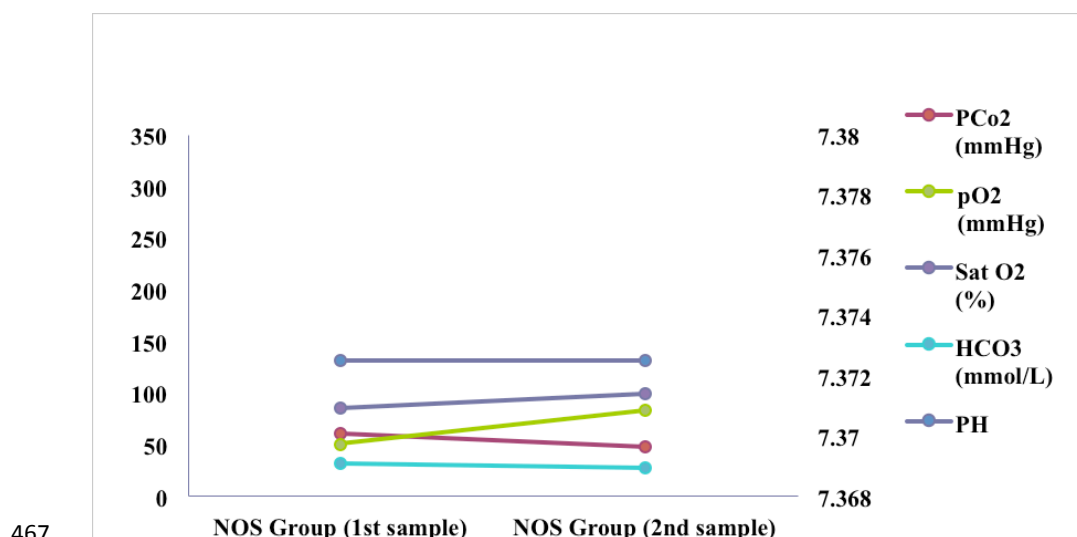
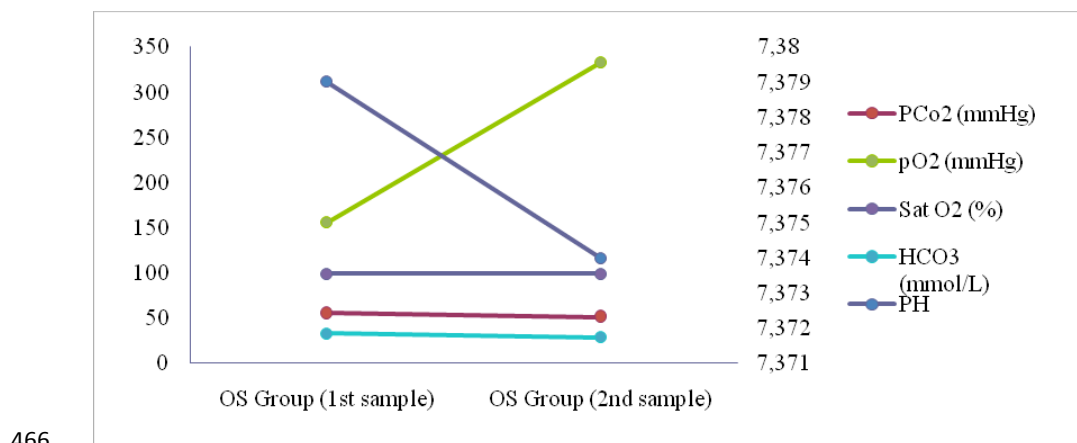
459

460

461

462 **Figure 1 - Arterial blood gas analysis**

463 Arterial blood gas analysis at beginning of procedure (first sample) and at end of
 464 procedure (second sample) in OS Group (oxygen supplemented) and NOS Group (non-
 465 oxygen supplemented).



471 **Table 2 – Occurrence of moderate and mild inflammatory response in the oxygen**
 472 **supplemented Group (OS) (n=80: 8 plates per rabbit) and non-oxygen**
 473 **supplemented Group (NOS) (n=80: 8 plates per rabbit) groups (Chi-Square**
 474 **p<0.001).**

475

	Moderate inflammatory response	Light inflammatory response	Total
OS Group	12	68	80
NOS Group	6	74	80
Total	18	142	160

476

4.2.7 Resultados globais

Face aos resultados das três séries, anteriormente apresentados, mostram-se na tabela 9, os resultados agregados e respectivas ilações em termos de significância.

Tabela 9. Resultados globais da resposta inflamatória pulmonar.

OR – odds ratio, VMP – ventilação monopulmonar, VBP – ventilação bipulmonar.

Série de estudo					Significância
1	Grupo VMP com oxigénio (coelhos n=10)		Grupo VBP com oxigénio (coelhos n=10)		Hipótese: inflamação moderada independente do tipo de ventilação Rejeitada p<0,05
	Inflamação ligeira	Inflamação moderada	Inflamação ligeira	Inflamação moderada	
	6	4	8	2	
2	Grupo VBP com oxigénio (coelhos n=10)		Grupo VBP sem oxigénio (coelhos n=10)		Hipótese: oxigénio é um fator que agrava a inflamação Aceite OR = 16 (Intervalo de confiança 1,8-142,3)
	Inflamação ligeira	Inflamação moderada	Inflamação ligeira	Inflamação moderada	
	2	8	8	2	
3	Grupo VMP com oxigénio (10 coelhos) Lâminas n=80		Grupo VMP sem oxigénio (10 coelhos) Lâminas n=80		Hipótese: inflamação moderada independente do suplemento do oxigénio (VMP) Rejeitada p<0,001
	Inflamação ligeira	Inflamação moderada	Inflamação ligeira	Inflamação moderada	
	68	12	74	6	

5 Discussão

Como parte do formato desta dissertação, foi decidido incluir a reprodução de artigos originais já publicados internacionalmente (ou aceites para publicação), razão pela qual os argumentos detalhados em discussão já se encontram nas secções “discussion” dos atrás citados artigos.

5.1 Série 1

Nesta série de estudos, os coelhos que foram submetidos a ventilação monopulmonar (VMP) tiveram maior intensidade de inflamação que os animais submetidos a ventilação bipulmonar (VBP).

No grupo de animais submetidos a VMP a resposta inflamatória foi mais intensa no pulmão excluído ou colapsado que no pulmão ventilado, sugerindo que a atelectasia do pulmão colapsado poderá conduzir a inflamação mais intensa. Contudo também se observou inflamação moderada no grupo de coelhos submetidos a VBP, embora em menor número de animais, o que levanta a possibilidade de se estar perante um mecanismo sistémico.

Estes resultados indicam que as alterações que surgem no pulmão colapsado, e que poderão também estar presentes no pulmão que se mantém a ventilar, embora com menor gravidade, apontando para a existência de zonas de atelectasia. Com base nesta interpretação, pode ser explicado porque mesmo num modelo não cirúrgico de ventilação espontânea (portanto sem a interferência de ventilação controlada, nem de manipulação cirúrgica), o ambiente

acídico local induzido por uma atelectasia, pode induzir inflamação, sendo este facto mais pronunciado quando estas áreas são mais extensas, como no caso do pulmão colapsado, em VMP. Assim, é pertinente assumir-se que um evento local de maior magnitude, como o colapso total de um pulmão, poderá induzir um efeito sistémico que afete os dois pulmões.

Em todos os animais foi utilizado um fluxo de gases frescos de 2 litros por minuto, através de um sistema de tipo Maplesson F, com uma modificação de Jackson-Rees, para que a movimentação do balão pudesse contribuir para a monitorização visual da frequência respiratória, habitualmente efetuada pela observação dos movimentos torácicos. Foi assumido que este procedimento, pela pressão positiva contínua que proporciona poderia hipoteticamente prevenir a formação de algumas atelectasias, situação que não foi confirmada, mas que deve ser referida.

O modelo animal aqui utilizado, por só ter utilizado ventilação espontânea, exclui os habituais efeitos nocivos da ventilação controlada, como o barotrauma (pelas altas pressões de *plateau*), o volutrauma (pela distensão alveolar), ou o stress de fricção pela abertura e fecho repetitivo dos alvéolos. Contudo, como foi já demonstrado por outros autores [10][17][7], quando estes fatores estão presentes, a duração do procedimento está associada a um maior grau de inflamação, o que não se verificou no presente estudo.

A cirurgia pulmonar tem uma mortalidade de 2 a 6%, de acordo com a complexidade dos procedimentos [72]. Atualmente, a mortalidade está mais relacionada com os problemas pulmonares pós-operatórios como a infecção, a lesão pulmonar aguda (LPA) e a sua versão mais grave o ARDS, do que é de causa cardíaca [10][73]. Os maiores fatores de risco para a ocorrência de LPA estão relacionados com a condição pré-operatória, a quantidade de ressecção pulmonar, a ventilação mecânica deletéria e a fluidoterapia intraoperatória [72]. É sabido que a VMP com volumes elevados (10 ml/kg) pode produzir um aumento significativo de marcadores inflamatórios e infiltração celular [74]. Outras causas de liberação de mediadores inflamatórios incluem a hiperóxia e níveis elevados de pressão positiva no final da expiração (PEEP) [33][18].

Existe evidência que o aparecimento das lesões histológicas ocorre tanto no pulmão colapsado como ventilado [20][44]. O pulmão ventilado pode ser sujeito a vários insultos (hiperóxia, hiperinsuflação, e/ou uma combinação deles) que são uma fonte potencial de stress oxidativo e resposta inflamatória [51]. Contudo nenhuma destas situações foram utilizadas neste estudo, o que nos leva a pensar na possibilidade da inflamação que ocorreu mais intensamente no grupo de VMP poder estar relacionada com a própria VMP.

A inflamação é caracterizada por profundas alterações na atividade celular, hipóxia tecidual e acidose metabólica. Estas modificações no metabolismo celular estão frequentemente

associados a vasculite e intenso recrutamento de vários tipos de células inflamatórias [7]. Além disso, é claro que a suplementação de oxigénio em todos os animais pode aumentar a possibilidade de ocorrência de inflamação, uma vez que o oxigénio ele próprio pode induzir a formação de áreas de atelectasia [62][75]. Estas áreas são ventiladas deficientemente ou simplesmente não ventiladas, e induzem elas próprias hipóxia local, com a consequente sinalização de mediadores inflamatórios. Contudo ambos os grupos de estudo tiveram suplementação com oxigénio, deixando assim o fator VMP (apenas presente num deles) como maior responsável de indução de uma resposta inflamatória mais intensa, como se verificou.

A população celular encontrada, na resposta inflamatória pulmonar deste estudo, teve como principais componentes celulares os polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, estes últimos em maioria, numa proporção que atingiu os 75% de todas estas células inflamatórias agudas.

Os eosinófilos estão envolvidos em vários processos inflamatórios que implicam um certo grau de atividade pro-fibrogénica e angiogénica, nomeadamente em situações de alergia crónica, como por exemplo a asma. Esta angiogénese está frequentemente ligada a condições hipóxicas em tecidos inflamados. Como os eosinófilos respondem à hipóxia com uma sobre-regulação, isto pode ser indicativo de uma correlação entre inflamação eosinofílica e hipóxia [59][75].

No presente estudo, não existiu a suspeita de alguma condição alérgica nos animais, uma vez que todos eles foram considerados saudáveis pelas observações clínicas efetuadas realizadas à chegada ao laboratório e durante o período de estádio em biotério; não foram visualizados quaisquer sinais de anormalidade de saúde dos animais, além de que todos tiveram um certificado de saúde emitido pelo próprio criador. Estes factos podem consubstanciar a ideia de que existe uma relação entre o ambiente hipóxico e a predominância eosinofílica encontrada.

Os resultados encontrados mostram que a existência de um ambiente tecidular ácido, seja pela formação da atelectasia que fez com que um dos pulmões estivesse excluído, e portanto com hipóxia tecidular, seja pela suplementação de oxigénio que por si também pode gerar pequenas zona de atelectasia e portanto também contribuir para o resultado final, pode explicar a predominância de eosinófilos, que como se referiu respondem ao fator hipóxia tecidular de uma forma particular.

Relativamente às diferenças encontradas ao nível da frequência respiratória, considerando todos os animais, verificou-se que esta tinha uma correlação negativa com o nível da inflamação ($p < 0,05$); este facto pode ser explicado pelo facto de um aumento da frequência respiratória cursar com menores valores de dióxido de carbono diminuindo assim a sua contribuição para um ambiente ácido sistémico e local.

5.2 Série 2

Os resultados nesta série de estudo mostram que a resposta inflamatória encontrada foi mais pronunciada no grupo que recebeu suplementação de oxigénio, com um ambiente hiperóxico, facto também encontrado noutros estudos [76][77][36], contudo a população celular encontrada como constituinte do infiltrado inflamatório agudo foi de polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos numa proporção de cerca de 20-25% para 75-80%, respetivamente.

Esta observação apesar de pouco esperada pode ser explicada pela evidência que existe na literatura; as células que mais frequentemente aparecem como população preponderante numa resposta inflamatória aguda no pulmão poderão ser leucócitos polimorfonucleares neutrófilos e/ou monócitos/macrófagos [18][78][59], contudo a implicação da série mieloide na resposta inflamatória tem sido ligada ao modelo hipóxico, quando existe acumulação de lactato e acidose metabólica [59].

É reconhecido que os eosinófilos estão capacitados para fazer frente a vários organismos e habilitados a causar danos em tecidos e causar doença [60]. Além disso também exibem algumas propriedades que podem suportar o facto de terem sido as células predominantes na análise histológica que foi efetuada [60]. Estas características incluem a sua possibilidade de migrar através das células endoteliais sem desgranulação e sem induzir vasculite, a sua capacidade de

aderência após enrolamento mínimo para mudar a sua forma, e a sua rápida distribuição na camada única de células endoteliais [60].

A questão que pode ser levantada relativamente ao estado de saúde dos animais utilizados no estudo, ou seja uma eosinofilia sistémica que pudesse estar subjacente, é excluída pelo resultado dos hemogramas efetuados no início e no fim do procedimento que mostraram valores celulares totalmente normais, com especial importância da quase ausência de eosinófilos no sangue periférico (figura 5). Este facto afasta a hipótese de poder existir uma qualquer co-morbilidade na população de animais utilizada para o estudo, que pudesse ser responsável pela preponderância eosinofílica encontrada.

O facto do infiltrado inflamatório encontrado ter sido mais expressivo no grupo com suplementação com oxigénio, neste caso com predominância de eosinófilos, pode parecer conflitar com estudos que mostram que a hipóxia pode ser um modulador da função eosinofílica [62], sendo que esta pode ser expressa como uma sobre regulação da sua sobrevivência destas células [62].

Com efeito, a suplementação de oxigénio, muitas vezes necessária para combater a hipóxia sistémica, tem como efeito lateral a remoção de nitrogénio dos alvéolos, conferindo-lhes a natural tendência a colapsarem após a absorção do oxigénio, gerando-se assim pequenas áreas de atelectasias de absorção [46][47], com a consequente criação de ambientes locais hipóxicos, de baixo pH,

geradores de shunt arterio-venoso (ambiente perfundido e não ventilado).

Nesta série de estudo, os animais com suplementação de oxigénio tiveram inflamação mais pronunciada do que os que respiraram ar ambiente, sem que a duração do procedimento influenciasse os resultados. Este facto está bem documentado, uma vez que o oxigénio é um conhecido agente iniciador de inflamação [76][77][36]. A associação de ventilação controlada e hiperóxia é conhecida como sinérgica para o aparecimento de uma lesão pulmonar associada ao ventilador [18].

Os resultados encontrados, no nosso modelo de ventilação espontânea, representam um novo olhar sobre esta matéria, na medida em que a evidência prévia (também em coelhos), mostrava apenas, que em modelos de curta duração, em ventilação controlada, poderia não existir um despoletar de inflamação pulmonar [79].

Como anteriormente referido, o objetivo de estudo da presente série era saber qual o impacto da suplementação de oxigénio em ventilação espontânea, sendo que se verificou que quando comparado com o ar ambiente condicionou uma resposta inflamatória bastante mais expressiva.

Assim, será razoável assumir que se o oxigénio for utilizado (mesmo num tempo reduzido de exposição de por exemplo 20 minutos), em ventilação espontânea, uma resposta inflamatória poderá ser despoletada e subsequentemente aumentada até uma

expressão moderada, de acordo com os critérios histológicos definidos.

A formação de atelectasias por exposição ao oxigénio está amplamente descrita na literatura [75][46] este facto pode explicar porque a suplementação de oxigénio pode vir a provocar um efeito local contrario (hipóxia), pela circunstância de existir uma absorção rápida do oxigénio administrado, perdendo-se o natural sustentador do alvéolo que é o azoto do ar respirável [46][47]. As modificações locais e a sinalização inflamatória modificam os ciclos celulares e a suas propriedades dando origem aos infiltrados inflamatórios que se encontram nestas condições [80][75].

As diferenças nos primeiros registos de frequência respiratória que foram observados nos animais desta série, podem dever-se ao facto de que o grupo de suplementação com oxigénio também tinha melhores valores de pO₂; assim, poder-se-á assumir que a frequência respiratória inicial do grupo sem suplemento de oxigénio poderá ser devida a um esforço suplementar para compensar algum grau de hipóxia sistémica, que foi evidenciado por uma pO₂ mais baixa neste grupo (figura 8 e 9).

Estes factos eram esperados e a evolução do trabalho experimental provou que esta frequência respiratória mais elevada do grupo sem suplemento de oxigénio acabou por aumentar a pO₂ no final do procedimento (figura 9).

5.3 Série 3

Ambos os grupos de coelhos apresentaram algum grau de inflamação pulmonar, evidenciado pelo aparecimento de pelo menos inflamação ligeira em todos os animais.

Este facto confirma a propensão que a VMP tem para que esta resposta inflamatória se desenvolva [71], confirmando a ideia de que valores de volume corrente próximos de valores fisiológicos podem também ser deletérios [81].

A ocorrência de uma resposta inflamatória mais pronunciada nos animais em VMP com suplemento de oxigénio, quando comparados com animais em VMP sem este suplemento ($p < 0,001$), confirma que o oxigénio suprafisiológico, pode aumentar a resposta inflamatória em VMP espontânea.

Este facto é novo, uma vez que estudos pregressos foram realizados em ventilação controlada, sendo que o mecanismo avançado seria a possibilidade do oxigénio per si, induzir o aparecimento de áreas não ventiladas, com a consequente instalação de ambientes locais hipóxicos, acídicos e com a respetiva repercussão inflamatória [75].

Nesta série de experiências, foi possível documentar uma pressão parcial de oxigénio superior no grupo de coelhos com suplementação de oxigénio, tal como esperado. Este facto poderá explicar a maior resposta inflamatória neste grupo de animais, apesar de todos os coelhos em estudo estarem a ser submetidos a VMP e

portanto com uma atelectasia induzida, que se traduzia pelo colapso total de um dos pulmões, com o consequente efeito de *shunt*. É sabido que os mecanismos geradores de inflamação são aumentados pela hipóxia tecidular [82], sendo que a exposição a oxigénio imposta no grupo com suplementação, pode por si só induzir mecanismos de resposta celular inflamatória por produção local de ROS [83][84].

A avaliação histológica dos pulmões destes coelhos mostrou uma resposta inflamatória ligeira e moderada, composta por polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos, sendo estes últimos mais de 75% dos granulócitos. Sabe-se que a hipóxia estimula os eosinófilos [62], já que o ambiente hipóxico induz a transcrição de alguns fatores, como o fator indutor de hipóxia (HIF-1), responsável pela homeostasia do oxigénio [85][86], mas também é causador de alterações no perfil celular dos eosinófilos, aumentando a sua capacidade de mobilização através de vasos sanguíneos (diapedese), diminuindo ainda a apoptose celular e prolongando a sua semivida [60][61][62].

As primeiras medidas de frequência respiratória (FR), saturação arterial periférica de oxigénio (SpO_2) e frequência cardíaca (FC) foram significativamente diferentes entre os dois grupos de coelhos ($p < 0,05$), facto que era esperado uma vez que estes registos foram efetuados imediatamente após a conclusão do set-up experimental, ou seja já existindo suplementação com oxigénio ao grupo 1 de animais (OSG). Este facto pode explicar porque a FR era mais baixa neste

grupo de coelhos, ou seja, seria necessário menor esforço compensatório para uma situação em que a hipóxia sistémica não estava presente. Pela mesma razão se observou uma SpO_2 mais elevada no grupo com suplementação de oxigénio, sendo que, contudo, a SpO_2 aumentou nos dois grupos da primeira para a última medição.

A temperatura corporal diminuiu nos dois grupos de animais essencialmente devido a arrefecimento passivo fenómeno ao qual não se atribuiu relevância, não só pelo facto da diminuição não ter sido diferente entre os dois grupos, como também porque não se encontra uma ligação entre este facto com o objetivo do estudo, a resposta inflamatória pulmonar.

A maior frequência cardíaca observada no grupo sem suplementação de oxigénio (4,9% com $p < 0,05$) pode estar ligada uma maior representação hipóxica sistémica. De facto, é admissível que numa fase inicial o incremento ou o estabelecimento de um ambiente hipóxico, com acidose subsequente, possa desencadear um estímulo simpático de aumento de débito cardíaco compensatório, aqui traduzido pelo aumento de frequência cardíaca.

A mediana da pO_2 (pressão parcial de oxigénio arterial) foi superior no grupo com suplementação de oxigénio, este facto suporta a maior frequência respiratória inicial no grupo sem suplementação de oxigénio. A oxigenação no grupo sem suplemento de oxigénio (NOSG) foi consistentemente subnormal, uma vez que apenas foi usado ar

ambiente na ventilação, sendo esta circunstância confirmada pelos valores inferiores de pO_2 . A mediana de valores de pO_2 aumentou nos dois grupos de coelhos, mas com maior expressão no grupo de animais sujeitos a suplementação com oxigénio (OSG) ($p<0,001$), o que era esperado dado existir maior margem de aumento.

No grupo NOSG existiu um aumento significativo da SpO_2 , de cerca de 15,7%, o que pode ser explicado pelo esforço de normalização da hipoxemia inicial. Contudo, o menor grau de inflamação pulmonar observada neste grupo de coelhos confirma que a suplementação de oxigénio no grupo OSG pode não ser a melhor solução para reverter hipoxemia em VMP, pelo menos numa dose que tenha como objetivo a subida da pO_2 para perto de valores normais. Assim, e tendo em consideração que será benéfico que a resposta inflamatória não seja tão marcada, pode estar indicado que se admita uma certa hipóxia sistémica permissiva, com vista a que se evite o aparecimento de regiões de hipóxia focal decorrentes da suplementação com oxigénio.

Apesar de aparentemente contraditório, há argumentos para se considerar a vantagem de evitar um tratamento muito intenso da hipóxia sistémica, porque a terapêutica de oxigénio a aplicar, poderá ela própria desencadear inflamação pulmonar e agravar a fisiologia pulmonar, com o subsequente risco de desenvolvimento de ALI ou de ARDS.

Os nossos resultados sugerem que o grupo de coelhos com oxigenação supranormal (quando comparado com um grupo de animais que manteve a sua ventilação espontânea monopulmonar ao ar ambiente, portanto relativamente hipóxico do ponto de vista sistémico), desenvolve uma mais intensa resposta inflamatória aguda, pelo menos neste modelo VMP espontânea. Estes resultados obtidos em coelhos em VMP confirmam a ação deletéria do excesso de oxigénio já conhecida em modelos de ventilação controlada monopulmonar.

A histologia mostrou que o pulmão esquerdo estava consistentemente colapsado e o direito arejado, tendo ambos sido colhidos e diretamente colocados na solução de fixação. Esta diferença não pode ser atribuída a qualquer tipo de manipulação dos pulmões, algo que especificamente não foi realizado. A não utilização de ventilação controlada, também eliminou esse potencial factor flogístico para o pulmão.

Existem alguns mecanismos que podem explicar a ocorrência de uma resposta inflamatória em ambos os pulmões. De referir que no presente estudo não se encontraram diferenças entre os dois lados. A mecanotransdução e a compartimentalização são fenómenos que resultam da transformação de determinadas forças físicas em sinalização inflamatória celular, o que, num ambiente propício à sua ocorrência pode despoletar e/ou aumentar todo um processo flogístico [75].

A existência de marcadores pró-inflamatórios em circulação (biotrauma), num contexto de resposta inflamatória sistêmica, pode também agravar uma lesão pulmonar aguda que esteja em evolução, apoiando a noção de agressão sistêmica, que suporta a bilateralidade das alterações histológicas encontradas nesta série de animais, como em outros estudos anteriores [33][35].

5.4 Discussão geral

5.4.1 Breve revisão da anestesia para cirurgia pulmonar

A intervenção anestésica pré-operatória dos doentes que vão ser submetidos a cirurgia pulmonar, a forma de gerir a ventilação intraoperatória, o tipo de analgesia instituída e a gestão clínica das complicações pós-operatórias são, atualmente, as áreas que mais têm sido investigadas e que mais têm evoluído, no campo da anestesia para cirurgia pulmonar.

No pré-operatório, em relação aos doentes que vão ser submetidos a cirurgia pulmonar, existem duas áreas principais de intervenção que frequentemente carecem de diagnóstico e otimização, respetivamente: a previsão de complicações pulmonares pós-operatórias [87] [88] [89] [90] e a instituição de medidas que possam melhorar o estado basal do doente [91] [92].

A previsão de complicações pós-operatórias pode ser de tal forma relevante que, resultante da sua inventariação, o resultado possa ser o cancelamento da cirurgia proposta. Esta situação acontece mais frequentemente quando o que está em causa é a remoção de tecido pulmonar, uma vez que a quantidade de tecido remanescente pode não ser compatível com a vida, ou seja, autónoma de ventilação artificial. Por outro lado, em determinadas patologias, o ato de se remover porções de pulmão pode, em si, resultar numa melhor função pós-operatória, como é o caso da ressecção de bolhas de enfisema

pulmonar. As melhoras, neste caso, explicam-se pelo facto de se remover pulmão não viável para trocas (espaço morto), dando espaço a que parênquima ainda viável possa, de uma forma compensatória ou vicariante, ocupar esse lugar, tanto do ponto de vista anatómico como fisiológico.

Do ponto de vista funcional, a compatibilidade da cirurgia pulmonar com a vida pode ser habitualmente medida através da previsão do FEV1 (Volume expiratório forçado no primeiro segundo), a FVC (capacidade vital forçada), e o ratio VR/TLC (volume residual/capacidade pulmonar total). Estes são os indicadores mais importantes. Contudo, é uma história clínica detalhada que, na maior parte das vezes, nos dá uma ideia concreta da qualidade de vida do doente [93] [1]. A medida que estratifica, de uma forma numérica, a possibilidade de ocorrência de complicações respiratórias pós-operatórias em cirurgia torácica é a FEV1 prevista pós-operatória (FEV1pp). A FEV1pp traduz-se pelo valor da FEV1 medida no pré-operatório, multiplicada pelo resto do tecido pulmonar removido ($FEV1pp = FEV1 - (1 - \% \text{ tecido pulmonar funcional} / 100)$), sendo que esta não deve ser superior a 40%. Com valores abaixo de 20%, a extubação na sala operatória costuma ocorrer sem problemas, e entre os 20 a 30% a extubação será melhor conseguida se a analgesia epidural tiver sido instituída, e a cirurgia tiver sido realizada por toracoscopia [1].

O segundo ramo de avaliação pré-operatória de complicações pulmonares pós-operatórias é a reserva cardiopulmonar ou, neste

caso, a interação com a função cardíaca. Mais uma vez, a clínica preside na avaliação de compatibilidade da reserva cardíaca com a cirurgia proposta, em que será necessário garantir um equivalente de movimento (por exemplo subida de dois lances de escadas, ou capacidade de andar seis minutos), associado a uma possibilidade de exercício, com uma diminuição máxima da saturação de 4%.

O consumo de oxigénio é também um dos indicadores mais relevantes na previsão de complicações pulmonares pós-operatórias, que nestes casos deve ser sempre superior a 15 ml/kg/min mas, idealmente deverá ser superior a 20 ml/kg/min [1].

Finalmente, a função parenquimatosa, ou de trocas gasosas, precisa de ser estudada no pré-operatório, uma vez que é necessário garantir que a PaO_2 deve ser superior a 60 mmHg, e a PaCO_2 inferior a 45 mmHg. Contudo, tem-se verificado que alguns doentes têm sido submetidos a resseções pulmonares, sem que estes critérios de *cutoff* sejam preenchidos. A difusão do monóxido de carbono (DLco) correlaciona-se com toda a superfície funcionante de trocas gasosas, sendo desta forma um excelente indicador de mortalidade peri-operatória, devendo o DLco previsto pós-operatório ser superior a 40 % do valor pré-operatório, sob pena de não ser possível realizar a cirurgia [1].

Além da previsão do risco de ocorrência de CPP e da possibilidade da cirurgia ser realizada, têm sido identificados outros fatores associados às CPP, inerentes ao doente como um todo, e não

apenas centrados no pulmão. Entre estes destacam-se a doença cardíaca nas suas várias vertentes, isquémica e/ou presença de arritmias, a idade, a condição de fumador [92], a anemia, a hipoxémia e o doente com doença pulmonar crónica obstrutiva [89].

Na necessidade de articulação das várias variáveis têm vindo a ser construídas algumas metodologias de cálculo que, de alguma forma, têm permitido quantificar o risco [94].

Com base nas avaliações pré-operatórias, têm vindo a ser cada vez mais necessárias e relevantes as intervenções de melhoria a realizar nos doentes antes da cirurgia. Destas destacam-se por exemplo, a fisioterapia respiratória, o tratamento de infeções, a resolução de eventuais atelectasias, a fluidificação de secreções, a cessação tabágica, tratamento do broncospasmo latente, e a expirimetria incentivada [92].

O desafio que se coloca atualmente quanto à ventilação intraoperatória em doentes submetidos a cirurgia torácica, tem duas vertentes essenciais: a manutenção da oxigenação intraoperatória, dado que a VMP é por si só uma amputação da capacidade de trocas gasosas, e as consequências desta ventilação no pós-operatório.

O ocorrência de hipoxémia intraoperatória em VMP, que acontece frequentemente, dada a morbilidade dos doentes, relaciona-se frequentemente com vários fatores, nomeadamente: alta percentagem de ventilação ou perfusão para o pulmão que irá ser

operado (estudo pré-operatório), baixa PaO_2 em VBP especialmente em decúbito lateral, toracotomia direita, doença pulmonar restritiva, e VMP em decúbito dorsal.

Os doentes que apresentarem fatores de risco de dessaturação arterial como os anteriormente referidos, deverão vê-los otimizados, sendo que o conceito de que temos um pulmão bastante mais pequeno quando estamos em VMP, não deve ser esquecido.

Vários estudos têm trazido novas noções que têm ajudado a compreender e intervir no combate à hipoxémia intraoperatória em VMP, nomeadamente manobras habitualmente realizadas em VBP, que realizadas imediatamente antes de instituir VMP (recrutamento alveolar), podem prevenir a ocorrência de hipoxémia significativa [95]. Contudo, em caso de ocorrência de dessaturação intraoperatória, após a confirmação da posição do tubo traqueal, da aspiração de eventuais secreções brônquicas, da otimização da fração inspirada de oxigénio, do controlo do débito cardíaco, a utilização de PEEP (2-5 cmH₂O) no pulmão que está a ser ventilado e de CPAP com oxigénio (1-2 cmH₂O) no pulmão que está a ser operado, constituem o estado da arte do tratamento da hipoxemia intraoperatória em VMP [93]. A última linha de defesa contra a dessaturação quando se está em VMP será a oclusão temporária intermitente do débito cardíaco ao pulmão não ventilado [1].

Numa lógica de entregar o melhor pulmão possível no recobro e consequentemente na enfermaria [47], não só as manobras de

recrutamento alveolar são relevantes em VMP, especialmente se forem utilizados pequenos volumes correntes que, por si, garantem menor probabilidade de atelectasias no pós-operatório, e que por isso beneficiem destas manobras, mas também será muito importante a utilização de pequenos volumes correntes [96] e o uso de ventilação controlada por pressão [97].

A dor após cirurgia torácica por toracotomia é intensa e prolongada. A inadequada analgesia está relacionada com a existência de complicações pós-operatórias importantes, que podem comprometer o sucesso da cirurgia, a sobrevida do doente e o aparecimento de síndromes dolorosas crônicas, a nível torácico [98].

O bloqueio paravertebral ou o bloqueio epidural torácico são atualmente as técnicas mais recomendadas, sendo útil a sua associação a analgésicos anti-inflamatórios ou outros não opióides [98].

A garantia de analgesia efetiva após estímulo nódico ao nível torácico, seja após uma incisão de toracotomia, ou após lesão traumática [99], é especialmente útil para proporcionar capacidade ventilatória, trocas gasosas e possibilidade de mobilizar secreções que, de outro modo, favoreceriam a ocorrência de infeções respiratórias pós-operatórias.

O bloqueio epidural torácico, bloqueia seletivamente as fibras que conduzem a nociceção do local da incisão, assim como a resposta

simpática inerente. Desta forma, associa-se a benefícios respiratórios (permite uma correta capacidade ventilatória pela analgesia que proporciona), cardíacos (porque impede que o estímulo simpático exerça as suas ações cardíacas – taquicardia e hipertensão) e metabólicos (o bloqueio simpático bloqueia a resposta catabólica desencadeada pelo stress) [100] [101] [102].

Assim, e relativamente ao pós-operatório, se a analgesia estiver otimizada, e adaptada ao tipo de abordagem efetuada, toracotomia ou toracoscopia, importa reconhecer as várias possibilidades de ocorrência de morbidade pós-operatória.

O estreito equilíbrio da transição ar-sangue a nível alvéolo capilar é particularmente sensível à volémia do doente. Assim, tanto no intraoperatório, como no pós-operatório é especialmente importante controlar o aporte de fluídos (valor alvo 1-2 ml/kg/h), de forma a que seja garantido um débito urinário mínimo e, por outro lado, se minimize a possibilidade de se formar edema pulmonar de tipo hidrostático (pressão artéria pulmonar superior a 18 mmHg) [103], que interferirá com as trocas gasosas e será mais um fator de morbidade.

A fisioterapia e a deambulação precoces são, atualmente, prioridades nos cuidados pós-operatórios e relacionam-se com a necessidade de profilaxia da trombose venosa profunda. É através destas medidas que se previne a acumulação de secreções, a possível

ocorrência de infecção e que se otimiza a função ventilatória e, portanto, as trocas gasosas.

As restantes complicações do pós-operatório precoce podem incluir a hemorragia, as arritmias (com uma incidência de fibrilação auricular de 10-20% dos doentes após lobectomia e até 40% após pneumectomia) [103], a isquemia miocárdica, a hérnia cardíaca, a insuficiência cardíaca, o edema pulmonar (5-14%), o síndrome pós-pneumectomia, a torção lobar, o tamponamento cardíaco, o quilotorax, a fistula bronco-pleural, e as infecções locais (5-24%) [103].

Em relação à entidade inflamatória das complicações pós-operatórias após toracotomia, nomeadamente o ARDS, que cursa com insuficiência respiratória, hipoxémia, infiltrados pulmonares radiograficamente visíveis, sem elevação da pressão capilar pulmonar, tem vindo a observar-se uma diminuição da sua incidência e mortalidade nos últimos 10 anos [104]. Este facto tem sido relacionado por alguns autores com a abordagem mais abrangente e multidisciplinar, no sentido de evitar a pneumectomia sempre que possível, com a instituição clara de estratégias protetoras de ventilação intraoperatória e com uma melhor gestão clínica dos doentes no pós-operatório imediato, nomeadamente nos cuidados intensivos [104]. Contudo, apesar destas melhorias, a mortalidade hospitalar de doentes com ARDS pós-toracotomia e ressecção pulmonar pode atingir os 25% [64].

Os fatores de risco identificados para o desenvolvimento de ARDS pós-pneumectomia, são os seguintes: idade superior a sessenta anos, sexo masculino, alcoolismo crónico, tabagismo, doença crónica supurativa, doença cardíaca, rádio ou quimioterapia prévias, perfusão pulmonar diminuída para menos de 55% do normal, pneumectomia (maior risco se direita ou justa-carina em comparação com esquerda ou afastada da carina), e pressões ventilatórias intraoperatórias elevadas, fluidoterapia intraoperatória e pós-operatória, grau de ressecção pulmonar, re-operação, administração de plasma fresco congelado e drenagem não balanceada do hemitoráx na pneumectomia [64].

A fisiopatologia que explica o aparecimento do ARDS, após ressecção pulmonar, relaciona o fenómeno com o facto da ressecção induzir a libertação de citocinas, com aumento de liquido intersticial e hipoxemia que, em simultâneo, com a redução do leito vascular pulmonar decorrente da ressecção, diminui a capacidade de drenagem linfática, contribuindo para agravar a acumulação de liquido intersticial pulmonar. Acresce que, a hiperóxia, a reperfusão após a re-insuflação e restabelecimento da perfusão e o volutrauma, todas agravam a libertação de citocinas [64].

Deste modo, o controlo destas variáveis em muito poderá contribuir para a minimização da ocorrência de ALI, ou da sua forma mais grave, o ARDS.

Vários autores têm estudado e implementado formas alternativas de proceder a cirurgia pulmonar na tentativa de evitar os riscos anteriormente descritos.

A cirurgia torácica vídeo-assistida, ou toracoscopia, é atualmente comum e globalmente aceite. Existem descrições de metodologias alternativas de toracoscopia com doente submetido a anestesia regional e sedação ligeira, para a realização de certas cirurgias, como as resseções em cunha de tecido pulmonar, segmetectomias e lobectomias. O reflexo da tosse é abolido através de bloqueio do vago intratorácico e a exclusão pulmonar através de realização de pneumotorax iatrogénico, mantendo-se o doente em ventilação espontânea durante o procedimento [105][106].

A utilização de bloqueio epidural torácico, em conjunto com bloqueio intercostal, associados a uma sedação consciente para um índice biespetral de 60 foi estudado e documentado como exequível [107].

A manutenção da ventilação espontânea num doente acordado, mínima ou moderadamente sedado, com uma componente neurológica e muscular mais fisiologicamente mantidas, evitando as várias possibilidades de desadaptação, têm sido os principais motivos para o desenvolvimento desta técnica. O tratamento do derrame pleural, do pneumotorax espontâneo, e a resseção em cunha estão entre as intervenções mais frequentemente executadas com esta técnica. As vantagens encontradas neste tipo de intervenção estão

relacionadas com a recuperação mais rápida e consistente que os doentes têm vindo a evidenciar [108].

Assim, considera-se existir um espaço relevante de inovação futura no que respeita à anestesia para cirurgia pulmonar, que passa exatamente pelo evitar da exclusão pulmonar e ventilação controlada, da utilização de relaxantes musculares, mantendo, deste modo, a ventilação do doente o mais próximo possível da sua ventilação fisiológica.

5.4.2 Os resultados desta investigação e a anestesia para cirurgia pulmonar

Os resultados da presente dissertação foram originados por três séries de experiências em modelo animal, que procuraram responder a três questões relacionadas com as complicações pulmonares pós-operatórias após cirurgia pulmonar, quando a ventilação monopulmonar é utilizada.

As três séries de estudo procuraram responder se o tipo de ventilação pulmonar por si só, pode ser um fator iniciador de inflamação pulmonar, particularmente se tiver um percurso clinicamente agressivo, como acontece na lesão pulmonar aguda (LPA ou ALI – acute lung injury), ou na forma ainda mais grave que é o síndrome de stress respiratório agudo (ARDS).

Os nossos resultados nos coelhos mostram que a ventilação monopulmonar espontânea, mesmo sem o conhecido contributo da ventilação controlada, pode induzir uma resposta inflamatória pulmonar de grau superior à que é encontrada após ventilação bipulmonar normal e fisiológica.

Confirmámos algo que é há muito conhecido: que o oxigénio, ele próprio poderia ser um fator iniciador de resposta inflamatória pulmonar.

Estudámos o potencial efeito sinérgico sobre a inflamação pulmonar da VMP e do oxigénio. Essa sinergia parece de facto existir:

o grau de inflamação causado pela VMP é agravado pela presença supra-fisiológica de oxigênio.

Assim, foi possível concluir que dois elementos que habitualmente são utilizados em anestesia para cirurgia pulmonar, podem ser tidos como pró-inflamatórios para o pulmão e que por isso deverão ser utilizados com um especial cuidado, porque apesar de tudo são essenciais para que possa ser efetuada a maioria das cirurgias pulmonares.

De referir que existem outros fatores que podem também contribuir para a inflamação pulmonar, e que são utilizados durante a cirurgia torácica, nomeadamente a ventilação com volumes correntes elevados, a manipulação cirúrgica do pulmão e a fluidoterapia intraoperatória.

Assim, nesta situação clínica de cirurgia pulmonar, existe sempre possibilidade de no pós-operatório, com a presença de todos estes fatores flogísticos, existir uma progressão para insuficiência respiratória através da instalação de um síndrome de tipo ALI ou ARDS.

5.4.3 Limitações dos trabalhos de investigação desta dissertação

Na anestesia para cirurgia pulmonar, o modelo de ventilação utilizado inclui vários fatores que, sendo considerados enviesamentos, poderão interferir com eventuais conclusões de estudos clínicos que se realizem em humanos, nomeadamente: uso de ventilação controlada, uso de tubos traqueais de duplo-lúmen ou bloqueadores brônquicos para exclusão pulmonar, manipulação do órgão (neste caso pulmão), e a própria exérese de tecido pulmonar.

A adopção de um modelo experimental em coelho foi decidida para evitar alguns destes fatores de enviesamento. Assim, foi possível tirar conclusões sobre variáveis em estudo de uma forma mais clara. É de referir que o modelo animal criado constitui uma forma de ventilação que se aproxima mais da fisiológica do que da praticada no bloco operatório. No entanto a transposição para o humano de resultados obtidos em qualquer modelo animal requer sempre bastante cautela.

Uma outra limitação que deve ser referenciada relaciona-se com o tempo de procedimento, uma vez que em cirurgia pulmonar existem várias durações que poderão ter implicações diferentes, num contexto em que os fatores que poderão despoletar uma resposta inflamatória pulmonar são de várias ordens e de intensidades também variadas. Neste trabalho experimental verificou-se, curiosamente, que não existia diferença entre procedimentos de duração de 20 ou 75 minutos.

Em termos gerais, é de referir que o tipo de resposta inflamatória encontrada nas várias séries foi sobreponível em termos de tipo de população celular, e também que a predominância de eosinófilos esteve sempre presente.

Para além dos mecanismos relacionados com a hipoxemia local e ambientes acídicos, será de assumir que este achado de predomínio de eosinófilos foi muito inesperado. Não existia previamente a noção de que estas iam ser as células preponderantes no pulmão inflamado, e também que os polimorfonucleares neutrófilos apareceriam em menor expressão. Assim, assumindo a pertinência de caracterizar as populações celulares encontradas, será importante que estudos futuros possam vir a melhor definir estas células, com outras metodologias que possam trazer um conhecimento mais detalhado e que utilizem técnicas de caracterização celular mais específicas.

Assume-se que uma gama mais larga de marcadores inflamatórios sistémicos e locais poderia ter sido investigada nesta dissertação. Fica para estudos futuros o doseamento destes marcadores, para uma melhor compreensão de todo o processo inflamatório pulmonar associado a alterações ventilatórias e à suplementação com oxigénio.

6 Conclusões

Na medida em que se construiu o presente trabalho partindo de três perguntas de investigação, apresentam-se as respetivas conclusões, em alinhamento com o inicialmente questionado, assim:

Pergunta 1 - A circunstância de se ventilar apenas um pulmão, excluindo o outro pulmão da ventilação fisiológica bilateral, através da formação de uma atelectasia total, será em si um fator que pode desencadear uma resposta inflamatória pulmonar?

- i. A ventilação monopulmonar espontânea, num modelo não cirúrgico, sem manipulação pulmonar induz o aparecimento de alterações inflamatórias em ambos os pulmões, provavelmente com predominância no pulmão colapsado. (Resultados da série 1)
- ii. As zonas de atelectasias estarão presentes não só no pulmão colapsado, como também poderão existir no pulmão que se mantém a ventilar. (Resultados da série 1)
- iii. Os infiltrados inflamatórios pulmonares encontrados, resultantes de áreas com hipóxia local, são predominantemente de natureza eosinofílica.

Pergunta 2 - O oxigénio, elemento que reconhecidamente pode despoletar inflamação pulmonar em modelos de ventilação controlada, poderá fazê-lo também num modelo sem ventilação controlada?

- iv. O oxigénio em quantidades supranormais aumenta a resposta inflamatória pulmonar em ventilação espontânea normal. (Resultados da série 2)
- v. A variável tempo parece não ter uma papel relevante, uma vez que não se encontraram diferenças entre as respostas inflamatórias de coelhos sujeitos a procedimentos mais longos quando comparados com iguais procedimentos de menor duração. (Resultados das séries 1 e 2)

Pergunta 3 - Se a VMP, em modelo de ventilação espontânea, for confirmado como um fator que despoleta inflamação pulmonar, esta poderá ser agravada pela utilização de oxigénio?

- vi. O oxigénio em quantidades supranormais aumenta a resposta inflamatória pulmonar, mesmo que em ventilação espontânea monopulmonar, ou seja num ambiente já propenso ao aparecimento deste tipo de resposta. (Resultados da série 3)

7 Considerações finais

A presente dissertação relata investigação que teve como seu mais ambicioso objetivo contribuir para novas atitudes clínicas que possam prevenir o aparecimento de complicações inflamatórias pulmonares no pós-operatório da cirurgia pulmonar.

Nas situações clínicas em que a janela terapêutica é particularmente estreita, ou seja em que existe a possibilidade de um determinado procedimento poder vir a ter um desfecho indesejado, como por exemplo resultar em lesão pulmonar aguda ou ALI após cirurgia torácica com VMP, torna-se útil prever que factores podem despoletar os processos iniciais conducentes à inflamação. São disso exemplo a fração inspirada de oxigénio intraoperatória, o volume corrente utilizado, e as formas à disposição do clínico para resolver problemas intraoperatórios.

No caso da cirurgia pulmonar em concreto, existe uma elevada probabilidade de ocorrência de episódios de hipoxemia sistémica grave intraoperatória; neste âmbito, é frequente e mandatório que o problema seja prontamente resolvido, a bem do sucesso da intervenção e do melhor interesse do doente. Nestas ocasiões, em que a decisão terapêutica é complexa, já que só temos um pulmão disponível para resolver o problema, é frequente que se tomem atitudes que podem a ter consequências nefastas. A tentação de se maximizar a fracção inspirada de oxigénio para 100% é enorme, sendo que, por outro lado, a tentativa de melhorar as trocas gasosas

pode levar à decisão de aumentar o volume corrente, não sendo raro que se aumente também a frequência respiratória, se introduza PEEP no pulmão a ser ventilado e para culminar toda esta potencial agressão, se adicione CPAP com uma mistura de gases frescos enriquecida em oxigênio ao pulmão que está a ser intervencionado cirurgicamente.

Este conjunto de acontecimentos que muitas vezes acontecem em simultâneo quando se ventila doentes para cirurgia torácica, pode redundar numa lesão pulmonar inequívoca, essencialmente despoletada por um processo inflamatório.

Os resultados encontrados no presente conjunto de trabalhos experimentais dão-nos informação sobre o que não privilegiar nestes contextos. Por exemplo, se for preciso resolver uma situação de hipoxemia sistémica, ou hipercapnia demasiado elevada, em ambiente de ventilação monopulmonar, e tendo em conta os riscos conhecidos, provavelmente será uma melhor decisão otimizar em primeira instância todas as variáveis que são eminentemente inócuas para o futuro dos pulmões daquele doente, uma vez que se sabe que risco se poderá correr.

O conceito de que a anestesia nos tempos atuais é segura está amplamente difundido na comunidade médica, contudo, a forma de ventilar determinado doente durante certos tipos de cirurgia, modifica significativamente o pulmão do paciente [47].

O uso de oxigénio é um fator causal de atelectasias, a magnitude com que se impõe um determinado volume corrente tem consequências inflamatórias. A necessidade de restaurar a capacidade residual funcional é fundamental para evitar hipoxémias sistémicas fatais, pelo que este equilíbrio entre as várias variáveis da equação é fulcral para o bom porto onde queremos chegar com o nosso doente.

Numa perspetiva mais abrangente, e tendo em consideração o doente no seu todo, o objetivo será incorporar todos os fatores protetores e indutores de um desfecho positivo e maximiza-los, sendo que, a informação decorrente da investigação que se vai realizando deve ser levada em consideração, uma vez que contribui com conhecimentos que nos permitem perceber alguns resultados ou desfechos que por vezes consideramos imprevisíveis e inesperados.

Humberto Machado, Março de 2015

8 Bibliografia

- [1] P. D. Slinger and J. H. Campos, "Chapter 59 - Anesthesia for Thoracic Surgery," in *Miller's Anesthesia*, Churchill Livingstone, 2009, pp. 1-119.
- [2] N. Goldenberg, B. Steinberg, W. Lee, D. Wijeyssundera, and B. Kavanagh, "Lung-protective Ventilation in the Operating Room," *Anesthesiology*, vol. 121, no. 1, pp. 1-5, 2014.
- [3] E. Futier and S. Jaber, "Lung-protective ventilation in abdominal surgery.," *Curr. Opin. Crit. Care*, vol. 20, no. 4, pp. 426-30, Aug. 2014.
- [4] A. S. Slutsky and V. M. Ranieri, "Ventilator-induced lung injury.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 22, pp. 2126-36, Nov. 2013.
- [5] M. Sentürk, "New concepts of the management of one-lung ventilation.," *Curr. Opin. Anaesthesiol.*, vol. 19, no. 1, pp. 1-4, Feb. 2006.
- [6] L. Gattinoni, E. Carlesso, and T. Langer, "Towards ultraprotective mechanical ventilation.," *Curr. Opin. Anaesthesiol.*, vol. 25, no. 2, pp. 141-7, Apr. 2012.
- [7] S. Jordan, J. a Mitchell, G. J. Quinlan, P. Goldstraw, and T. W. Evans, "The pathogenesis of lung injury following pulmonary resection.," *Eur. Respir. J.*, vol. 15, no. 4, pp. 790-9, Apr. 2000.
- [8] J. Pugin, I. Dunn, P. Jolliet, D. Tassaux, J. L. Magnenat, L. P. Nicod, and J. C. Chevrolet, "Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro.," *Am. J. Physiol.*, vol. 275, no. 6 Pt 1, pp. L1040-50, Dec. 1998.
- [9] M. Amato, C. Barbas, D. Medeiros, R. Magaldi, G. Schettino, G. Lorenzi-filho, and E. Al, "Effect of protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome," *NEJM*, vol. 348, pp. 347-354, 1998.
- [10] S. V. Baudouin, "Lung injury after thoracotomy," *Br. J. Anaesth.*, vol. 91, no. 1, pp. 132-142, Jul. 2003.

- [11] M. Licker, M. de Perrot, A. Spiliopoulos, J. Robert, J. Diaper, C. Chevalley, and J.-M. Tschopp, "Risk Factors for Acute Lung Injury After Thoracic Surgery for Lung Cancer," *Anesth. Analg.*, vol. 97, no. 6, pp. 1558–1565, Dec. 2003.
- [12] S. Y. Jeon K, Yoon JW, Suh GY, Kim K, Yang M, Kim H, Kwon OJ, "Risk factors for post-pneumectomy acute lung injury/acute respiratory distress syndrome in primary lung cancer patients," *Anaesth Intensive Care*, vol. 37, no. 1, pp. 14–9, 2009.
- [13] J. Gothard, "Lung injury after thoracic surgery and one-lung ventilation.," *Curr. Opin. Anaesthesiol.*, vol. 19, no. 1, pp. 5–10, Feb. 2006.
- [14] E. Seiberlich, J. A. Santana, R. D. A. Chaves, and R. C. Seiberlich, "Ventilação Mecânica Protetora , Por Que Utilizar?," *Rev Bras Anesthesiol*, vol. 61, pp. 663–667, 2011.
- [15] American Thoracic Society, European Society of Intensive Care Medicine, "International Consensus Conferences in Intensive Care Medicine : Ventilator-associated Lung Injury in ARDS," *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 160, pp. 2118–2124, 1999.
- [16] H. Imanaka, M. Shimaoka, N. Matsuura, M. Nishimura, N. Ohta, and H. Kiyono, "Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF-beta 1 mRNA upregulation in rat lungs.," *Anesth. Analg.*, vol. 92, no. 2, pp. 428–36, Feb. 2001.
- [17] K. Takenaka, Y. Nishimura, T. Nishiuma, A. Sakashita, T. Yamashita, K. Kobayashi, M. Satouchi, T. Ishida, S. Kawashima, and M. Yokoyama, "Ventilator-induced lung injury is reduced in transgenic mice that overexpress endothelial nitric oxide synthase.," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 290, no. 6, pp. L1078–86, Jun. 2006.
- [18] D. a Quinn, R. K. Moufarrej, A. Volokhov, and C. a Hales, "Interactions of lung stretch, hyperoxia, and MIP-2 production in ventilator-induced lung injury.," *J. Appl. Physiol.*, vol. 93, no. 2, pp. 517–25, Aug. 2002.
- [19] J.-D. Ricard, D. Dreyfuss, and G. Saumon, "Ventilator-induced lung injury," *Eur. Respir. J.*, vol. 22, no. Supplement 42, p. 2s–9s, Aug. 2003.

- [20] M. R. Wilson, S. Choudhury, M. E. Goddard, K. P. O'Dea, A. G. Nicholson, and M. Takata, "High tidal volume upregulates intrapulmonary cytokines in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury.," *J. Appl. Physiol.*, vol. 95, no. 4, pp. 1385-93, Oct. 2003.
- [21] I. B. Copland, F. Martinez, B. P. Kavanagh, D. Engelberts, C. McKerlie, J. Belik, and M. Post, "High tidal volume ventilation causes different inflammatory responses in newborn versus adult lung.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 169, no. 6, pp. 739-48, Mar. 2004.
- [22] M. J. Schultz, J. J. Haitsma, A. S. Slutsky, and O. Gajic, "What tidal volumes should be used in patients without acute lung injury?," *Anesthesiology*, vol. 106, no. 6, pp. 1226-31, Jun. 2007.
- [23] L.-F. Li, L. Yu, and D. a Quinn, "Ventilation-induced neutrophil infiltration depends on c-Jun N-terminal kinase.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 169, no. 4, pp. 518-24, Feb. 2004.
- [24] N. G. Hall, Y. Liu, J. M. Hickman-Davis, G. C. Davis, C. Myles, E. J. Andrews, S. Matalon, and J. D. Lang, "Bactericidal function of alveolar macrophages in mechanically ventilated rabbits.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 34, no. 6, pp. 719-26, Jun. 2006.
- [25] S. Hammerschmidt, H. Kuhn, U. Sack, A. Schlenska, C. Gessner, A. Gillissen, and H. Wirtz, "Mechanical stretch alters alveolar type II cell mediator release toward a proinflammatory pattern.," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 33, no. 2, pp. 203-10, Aug. 2005.
- [26] K. Yin, E. Gribbin, S. Emanuel, R. Orndorff, J. Walker, J. Weese, and M. Fallahnejad, "Histochemical alterations in one lung ventilation.," *J. Surg. Res.*, vol. 137, no. 1, pp. 16-20, Jan. 2007.
- [27] M. Gama de Abreu, M. Heintz, A. Heller, R. Széchényi, D. M. Albrecht, and T. Koch, "One-lung ventilation with high tidal volumes and zero positive end-expiratory pressure is injurious in the isolated rabbit lung model.," *Anesth. Analg.*, vol. 96, no. 1, pp. 220-8, table of contents, Jan. 2003.
- [28] V. Kumar, A. Abbas, N. Fausto, and J. Aster, *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 8th Edition*. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA USA, 2010.

- [29] K. P. Grichnik and A. Shaw, "Update on one-lung ventilation: the use of continuous positive airway pressure ventilation and positive end-expiratory pressure ventilation--clinical application.," *Curr. Opin. Anaesthesiol.*, vol. 22, no. 1, pp. 23–30, Feb. 2009.
- [30] P. Misthos, S. Katsaragis, N. Milingos, S. Kakaris et al, "Postresectional pulmonary oxidative stress in lung cancer patients. The role of one-lung ventilation," *Eur. J. Cardiothoracic Surg.*, vol. 27, no. 3, pp. 379–383, 2005.
- [31] J. Lohser, "Evidence-based management of one-lung ventilation.," *Anesthesiol. Clin.*, vol. 26, no. 2, pp. 241–72, v, Jun. 2008.
- [32] P. Michelet, a. Roch, D. Brousse, X.-B. D'Journo, F. Bregeon, D. Lambert, G. Perrin, L. Papazian, P. Thomas, J.-P. Carpentier, and J.-P. Auffray, "Effects of PEEP on oxygenation and respiratory mechanics during one-lung ventilation.," *Br. J. Anaesth.*, vol. 95, no. 2, pp. 267–73, Aug. 2005.
- [33] T. Schilling, a. Kozian, M. Kretzschmar, C. Huth, T. Welte, F. Bühling, G. Hedenstierna, and T. Hachenberg, "Effects of propofol and desflurane anaesthesia on the alveolar inflammatory response to one-lung ventilation.," *Br. J. Anaesth.*, vol. 99, no. 3, pp. 368–75, Sep. 2007.
- [34] A. Kozian, T. Schilling, F. Fredén, E. Maripuu, C. Röcken, C. Strang, T. Hachenberg, and G. Hedenstierna, "One-lung ventilation induces hyperperfusion and alveolar damage in the ventilated lung: an experimental study.," *Br. J. Anaesth.*, vol. 100, no. 4, pp. 549–59, Apr. 2008.
- [35] Y. Sugawara, K. Yamaguchi, S. Kumakura, T. Murakami, T. Kugimiya, K. Suzuki, I. Nagaoka, and E. Inada, "The effect of one-lung ventilation upon pulmonary inflammatory responses during lung resection.," *J. Anesth.*, vol. 25, no. 2, pp. 170–7, Apr. 2011.
- [36] Y. Suzuki, K. Nishio, K. Takeshita, O. Takeuchi, K. Watanabe, N. Sato, K. Naoki, H. Kudo, and T. Aoki, "Effect of steroid on hyperoxia-induced ICAM-1 expression in pulmonary endothelial cells," *Am J Physiol Lung Cell*, vol. 278, pp. 245–252, 2000.
- [37] M. C. Theroux, A. Oliviant, D. Lim, J. P. Bernardi, A. T. Costarino, T. H. Shaffer, and T. L. Miller, "Low dose methylprednisolone

- prophylaxis to reduce inflammation during one-lung ventilation.," *Paediatr. Anaesth.*, vol. 18, no. 9, pp. 857–64, Sep. 2008.
- [38] J. A. Frank, P. E. Parsons, and M. a Matthay, "Pathogenetic significance of biological markers of ventilator-associated lung injury in experimental and clinical studies.," *Chest*, vol. 130, no. 6, pp. 1906–14, Dec. 2006.
- [39] N. Barnett and L. Ware, "Biomarkers in Acute Lung Injury - marking forward progress," *Crit Care Clin*, vol. 27, no. 3, pp. 661–683, 2011.
- [40] E. De Conno, M. P. Steurer, M. Wittlinger, M. P. Zalunardo, W. Weder, D. Schneiter, R. C. Schimmer, R. Klaghofer, T. a Neff, E. R. Schmid, D. R. Spahn, B. R. Z'graggen, M. Urner, and B. Beck-Schimmer, "Anesthetic-induced improvement of the inflammatory response to one-lung ventilation.," *Anesthesiology*, vol. 110, no. 6, pp. 1316–26, Jun. 2009.
- [41] Y. Sugawara, K. Yamaguchi, S. Kumakura, T. Murakami, K. Suzuki, I. Nagaoka, and E. Inada, "Effects of sevoflurane and propofol on pulmonary inflammatory responses during lung resection.," *J. Anesth.*, vol. 26, no. 1, pp. 62–9, Feb. 2012.
- [42] M. Koeppen, T. Eckle, and H. K. Eltzschig, "The hypoxia-inflammation link and potential drug targets.," *Curr. Opin. Anaesthesiol.*, vol. 24, no. 4, pp. 363–9, Aug. 2011.
- [43] A. O. Fisher, K. Husain, M. R. Wolfson, L. Hubert, E. Rodriguez, T. H. Shaffer, and C. Mary, "Hyperoxia during OLV: inflammatory and oxydative responses," vol. 47, no. 10, pp. 979–986, 2012.
- [44] C. Tekinbas, H. Ulusoy, E. Yulug, M. M. Erol, A. Alver, E. Yenilmez, S. Geze, and M. Topbas, "One-lung ventilation: for how long?," *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 134, no. 2, pp. 405–10, Aug. 2007.
- [45] L. Magnusson, "New concepts of atelectasis during general anaesthesia," *Br. J. Anaesth.*, vol. 91, no. 1, pp. 61–72, Jul. 2003.
- [46] G. Hedenstierna, "Effects of anaesthesia on ventilation/perfusion matching.," *Eur. J. Anaesthesiol.*, vol. 31, no. 9, pp. 447–9, Sep. 2014.

- [47] G. Hedenstierna, "Oxygen and anesthesia: what lung do we deliver to the post-operative ward?," *Acta Anaesthesiol. Scand.*, vol. 56, no. 6, pp. 675–85, Jul. 2012.
- [48] G. Tusman, S. H. Böhm, D. O. Warner, and J. Sprung, "Atelectasis and perioperative pulmonary complications in high-risk patients.," *Curr. Opin. Anaesthesiol.*, vol. 25, no. 1, pp. 1–10, Feb. 2012.
- [49] P. Bauer, "Postpneumonectomy pulmonary oedema revisited.," *Eur. Respir. J.*, vol. 15, no. 4, pp. 629–30, Apr. 2000.
- [50] M. Nakamura, S. Fujishima, M. Sawafuji, a Ishizaka, T. Oguma, K. Soejima, H. Matsubara, S. Tasaka, K. Kikuchi, K. Kobayashi, E. Ikeda, M. Sadick, C. a Hebert, N. Aikawa, M. Kanazawa, and K. Yamaguchi, "Importance of interleukin-8 in the development of reexpansion lung injury in rabbits.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 161, no. 3 Pt 1, pp. 1030–6, Mar. 2000.
- [51] Y. Sakao, O. Kajikawa, T. R. Martin, Y. Nakahara, W. a Hadden, C. L. Harmon, and E. J. Miller, "Association of IL-8 and MCP-1 with the development of reexpansion pulmonary edema in rabbits.," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 71, no. 6, pp. 1825–32, Jun. 2001.
- [52] T. Funakoshi, Y. Ishibe, N. Okazaki, K. Miura, R. Liu, S. Nagai, and Y. Minami, "Effect of re-expansion after short-period lung collapse on pulmonary capillary permeability and pro-inflammatory cytokine gene expression in isolated rabbit lungs.," *Br. J. Anaesth.*, vol. 92, no. 4, pp. 558–63, Apr. 2004.
- [53] A. Young and S. K. Ramachandran, "Clinical prediction of postoperative respiratory failure.," *Anesthesiology*, vol. 118, no. 6, pp. 1247–9, Jun. 2013.
- [54] H. J. M. Lemmens, J. B. Brodsky, and D. P. Bernstein, "Estimating ideal body weight--a new formula.," *Obes. Surg.*, vol. 15, no. 7, pp. 1082–3, Aug. 2005.
- [55] A. Fernandez-Bustamante, J. Klawitter, J. E. Repine, A. Agazio, A. J. Janocha, C. Shah, M. Moss, I. S. Douglas, Z. V. Tran, S. C. Erzurum, U. Christians, and T. Seres, "Early Effect of Tidal Volume on Lung Injury Biomarkers in Surgical Patients with Healthy Lungs.," *Anesthesiology*, no. 3, pp. 469–481, May 2014.

- [56] E. Futier, J.-M. Constantin, C. Paugam-Burtz, J. Pascal, M. Eurin, A. Neuschwander, E. Marret, M. Beaussier, C. Gutton, J.-Y. Lefrant, B. Allaouchiche, D. Verzilli, M. Leone, A. De Jong, J.-E. Bazin, B. Pereira, and S. Jaber, "A trial of intraoperative low-tidal-volume ventilation in abdominal surgery.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 369, no. 5, pp. 428-37, Aug. 2013.
- [57] S. N. T. Hemmes, P. Severgnini, S. Jaber, J. Canet, H. Wrigge, M. Hiesmayr, E. M. Tschernko, M. W. Hollmann, J. M. Binnekade, G. Hedenstierna, C. Putensen, M. G. de Abreu, P. Pelosi, and M. J. Schultz, "Rationale and study design of PROVHILO - a worldwide multicenter randomized controlled trial on protective ventilation during general anesthesia for open abdominal surgery.," *Trials*, vol. 12, no. 1, p. 111, Jan. 2011.
- [58] P. Michelet, X. D'Journo, A. Roch, C. Doddoli, V. Marin, L. Papazian, I. Decamps, F. Bregeon, P. Thomas, and J. Auffray, "Protective Ventilation influences systemic inflammation after Esophagectomy: A Randomized Controlled Study," *Anesthesiology*, vol. 105, no. 5, pp. 911-919, 2006.
- [59] J. Karhausen and V. H. Haase, "Inflammatory Hypoxia Perspective Role of Hypoxia-Inducible Factor," *Cell Cycle*, vol. 4, no. 2, pp. 256-258, 2005.
- [60] G. J. Gleich, "Mechanisms of eosinophil-associated inflammation.," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 105, no. 4, pp. 651-63, Apr. 2000.
- [61] X. Zhu, E. Mose, and N. Zimmermann, "Proton channel HVCN1 is required for effector functions of mouse eosinophils.," *BMC Immunol.*, vol. 14, no. 1, p. 24, Jan. 2013.
- [62] A. H. Nissim Ben Efraim, R. Eliashar, and F. Levi-Schaffer, "Hypoxia modulates human eosinophil function.," *Clin. Mol. Allergy*, vol. 8, p. 10, Jan. 2010.
- [63] The ARDS definition task-force, "Acute respiratory distress syndrome: the Berlin definition," *JAMA*, vol. 307, no. 6, pp. 2526-2533, 2012.
- [64] T. Kometani, T. Okamoto, S. Yoshida, and I. Yoshino, "Acute respiratory distress syndrome after pulmonary resection.," *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, vol. 61, no. 9, pp. 504-12, Sep. 2013.

- [65] R. M. Marques, L. Teixeira, A. P. Águas, J. C. Ribeiro, A. Costa-e-silva, and P. G. Ferreira, "Immunosuppression abrogates resistance of young rabbits to Rabbit Haemorrhagic Disease (RHD)," *Vet. Res.*, vol. 45, no. 14, pp. 2–7, 2014.
- [66] Eisenkraft JB, "Anesthesia delivery systems," in *Principles and practice of anesthesiology*, Second edi., G. E. Longnecker, D.E., Tinker, J.H., and Morgan Jr, Ed. Mosby, 1998, pp. 1001–1063.
- [67] Jackson-Rees G, "Anaesthesia in the newborn," *Br Med J*, vol. 2, p. 1419, 1950.
- [68] C. Lamagna, P. Scapini, J. a van Ziffle, A. L. DeFranco, and C. a Lowell, "Hyperactivated MyD88 signaling in dendritic cells, through specific deletion of Lyn kinase, causes severe autoimmunity and inflammation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 35, pp. E3311–20, Aug. 2013.
- [69] C. Lamagna, P. Scapini, J. a van Ziffle, A. L. DeFranco, and C. a Lowell, "Supporting Information - Hyperactivated MyD88 signaling in dendritic cells, through specific deletion of Lyn kinase, causes severe autoimmunity and inflammation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, no. 35, pp. 1–10, 2013.
- [70] Mead, *The design of experiments. Edn 1 Cambridge university press, cambridge, new york*. 1988, p. 1988.
- [71] H. S. Machado, P. Sa, C. S. Nunes, A. Couceiro, A. M. da Silva, and A. Águas, "Spontaneous one-lung ventilation increases the lung inflammatory response: an experimental pilot study," *Anesth. Clin. Res.*, vol. 5, no. 8, 2014.
- [72] P. Misthos, S. Katsaragakis, N. Milingos, S. Kakaris, E. Sepsas, K. Athanassiadi, D. Theodorou, and I. Skottis, "Postresectional pulmonary oxidative stress in lung cancer patients. The role of one-lung ventilation.," *Eur. J. Cardiothorac. Surg.*, vol. 27, no. 3, pp. 379–82; discussion 382–3, Mar. 2005.
- [73] M. Licker, M. de Perrot, L. Höhn, J. M. Tschopp, J. Robert, J. G. Frey, A. Schweizer, and A. Spiliopoulos, "Perioperative mortality and major cardio-pulmonary complications after lung surgery for non-small cell carcinoma.," *Eur. J. cardio-thoracic Surg.*, vol. 15, no. 3, pp. 314–9, Mar. 1999.

- [74] M. Licker, P. Fauconnet, Y. Villiger, and J.-M. Tschopp, "Acute lung injury and outcomes after thoracic surgery.," *Curr. Opin. Anaesthesiol.*, vol. 22, no. 1, pp. 61–7, Feb. 2009.
- [75] B. Kilpatrick and P. Slinger, "Lung protective strategies in anaesthesia.," *Br. J. Anaesth.*, vol. 105 Suppl , pp. i108–16, Dec. 2010.
- [76] P.J. Lee, J. Alam , W. Sylvester, N. Inamdar, L. Otterbein and AMK Choi, "Regulation of heme oxygenase-1 expression in vivo and in vitro in hyperoxic lung injury.," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 14, pp. 556–68, 1996.
- [77] J. R. Horinouchi H, Wang CC, Shepherd KE, "TNF gene and protein expression in alveolar macrophages in acute and chronic hyperoxia-induced lung injury.," *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 14, pp. 548–55, 1996.
- [78] M. R. Wilson, K. P. O'Dea, D. Zhang, A. D. Shearman, N. van Rooijen, and M. Takata, "Role of lung-marginated monocytes in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury.," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 179, no. 10, pp. 914–22, May 2009.
- [79] P. Kopterides, T. Kapetanakis, I. I. Siempos, C. Magkou, A. Pelekanou, T. Tsaganos, E. Giamarellos-Bourboulis, C. Roussos, and A. Armaganidis, "Short-term administration of a high oxygen concentration is not injurious in an ex-vivo rabbit model of ventilator-induced lung injury.," *Anesth. Analg.*, vol. 108, no. 2, pp. 556–64, Feb. 2009.
- [80] R. L. Britt RD, Velten M, Tipple ME, Nelin LD, "Cyclooxygenase-2 in newborn hyperoxic lung injury.," *Free Radic Biol Med*, vol. 61, pp. 502–511, 2013.
- [81] A. Moriondo, P. Pelosi, A. Passi, M. Viola, C. Marcozzi, P. Severgnini, V. Ottani, M. Quaranta, and D. Negrini, "Proteoglycan fragmentation and respiratory mechanics in mechanically ventilated healthy rats.," *J. Appl. Physiol.*, vol. 103, no. 3, pp. 747–56, Sep. 2007.
- [82] H. K. Eltzschig and P. Carmeliet, "Hypoxia and inflammation.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 364, no. 7, pp. 656–65, Feb. 2011.

- [83] G. Della Rocca and C. Coccia, "Ventilatory management of one-lung ventilation.," *Minerva Anesthesiol.*, vol. 77, no. 5, pp. 534-6, May 2011.
- [84] G. Della Rocca and C. Coccia, "Acute lung injury in thoracic surgery.," *Curr. Opin. Anaesthesiol.*, vol. 26, no. 1, pp. 40-6, Feb. 2013.
- [85] C. Murdoch, M. Muthana, and C. E. Lewis, "Hypoxia Regulates Macrophage Functions in Inflammation," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 10, pp. 6257-6263, Nov. 2005.
- [86] T. Cramer and R. S. Johnson, "A Novel Role for the Hypoxia Inducible Transcription Factor HIF-1 α ," *Cell Cycle*, vol. 2, no. 3, pp. 192-193, 2003.
- [87] A. Brunelli, G. Varela, G. Rocco, L. Socci, N. Novoa, T. Gatani, and M. Salati, "A model to predict the immediate postoperative FEV1 following major lung resections," *Eur J Cardiothorac. surg.*, vol. 32, pp. 783-6, 2007.
- [88] M. Ferguson and W. Vigneswaran, "Diffusing Capacity Predicts Morbidity After Lung Resection in Patients Without Obstructive Lung Disease," *Ann. Thorac. Surg.*, vol. 85, pp. 1158-65, 2008.
- [89] E. Fernandes, C. Teixeira, and L. Correia-da-Silva, "Thoracic surgery : risk factors for postoperative complications of lung resection," *Revi Assoc Med Bras*, vol. 57, no. 3, pp. 292-98, 2011.
- [90] A. Tsiouris, H. M. Horst, G. Paone, A. Hodari, M. Eichenhorn, and I. Rubinfeld, "Preoperative risk stratification for thoracic surgery using the American College of Surgeons National Surgical Quality Improvement Program data set: functional status predicts morbidity and mortality.," *J. Surg. Res.*, vol. 177, no. 1, pp. 1-6, Sep. 2012.
- [91] E. Lim, D. Baldwin, M. Beckles, and E. Al, "Guidelines on the radical management of patients with lung cancer," *Thorax*, vol. 65, no. suppl III, pp. 1-27, 2010.
- [92] P. Slinger and G. Darling, "Principles and Practice of Anesthesia for Thoracic Surgery," in *Principles and practice of anesthesia for*

- thoracic surgery*, P. Slinger, MD, FRCPC, Ed. New York, NY: Springer New York, 2011, pp. 11–34.
- [93] G. Hedenstierna, “Chapter 15 - Respiratory Physiology,” in *Miller’s Anesthesia*, Churchill Livingstone, vol. 3, 2009, pp. 1–56.
 - [94] F. Leo, N. Venissac, D. Pop, M. Anziani, M. E. Leon, and J. Mouroux, “Anticipating pulmonary complications after thoracotomy: the FLAM Score.,” *J. Cardiothorac. Surg.*, vol. 1, p. 34, Jan. 2006.
 - [95] C. Unzueta, G. Tusman, and F. Suarez-Sipmann, “Alveolar Recruitment Improves Ventilation During Thoracic Surgery,” *Br. J. Anaesth.*, vol. 56, no. 6, pp. 270–271, Dec. 2011.
 - [96] A. Kozian, T. Schilling, H. Schutze, M. Senturk, T. Hachenberg, and G. Hedenstierna, “Ventilatory Protective Strategies during Thoracic Surgery,” *Anesthesiology*, vol. 114, no. 5, pp. 1025–35, 2011.
 - [97] M. Yang, H. J. Ahn, K. Kim, J. A. Kim, C. a Yi, M. J. Kim, and H. J. Kim, “Does a protective ventilation strategy reduce the risk of pulmonary complications after lung cancer surgery?: a randomized controlled trial.,” *Chest*, vol. 139, no. 3, pp. 530–7, Mar. 2011.
 - [98] A. Romero, J. Garcia, and G. Joshi, “The state of the art in preventing postthoracotomy pain,” *Semin Thorac. Cardiovasc surg*, vol. 25, no. 2, pp. 116–24, 2013.
 - [99] E. M. Bulger, W. T. Edwards, M. de Pinto, P. Klotz, and G. J. Jurkovich, “Indications and contraindications for thoracic epidural analgesia in multiply injured patients,” *Acute Pain*, vol. 10, no. 1, pp. 15–22, Mar. 2008.
 - [100] G. McLeod and C. Cumming, “Thoracic epidural anaesthesia and analgesia,” *Contin. Educ. Anaesthesia, Crit. Care Pain*, vol. 4, no. 1, pp. 16–19, Feb. 2004.
 - [101] H. Freise and H. K. Van Aken, “Risks and benefits of thoracic epidural anaesthesia.,” *Br. J. Anaesth.*, vol. 107, no. 6, pp. 859–68, Dec. 2011.

- [102] S. Manion and T. Brennan, "Thoracic epidural analgesia and acute pain management," *Anesthesiology*, vol. 115, no. 1, pp. 181–88, 2011.
- [103] A. Iyer and S. Yadav, "Postoperative Care and Complications After Thoracic Surgery," in *Principles and practice of cardiothoracic surgery*, In Tech, 2013, pp. 57–84.
- [104] S. Tang, K. Redmond, M. Griffiths, and E. Al, "The mortality from acute respiratory distress syndrome after pulmonary resection is reducing : a 10-year single institutional experience," *Eur J Cardiothorac. surg*, vol. 34, pp. 898–902, 2008.
- [105] M.H. Hung, H.-H. Hsu, Y.-J. Cheng, and J.-S. Chen, "Nonintubated thoracoscopic surgery: state of the art and future directions.," *J. Thorac. Dis.*, vol. 6, no. 1, pp. 2–9, Jan. 2014.
- [106] J.T. Yang, M.-H. Hung, J.-S. Chen, and Y.-J. Cheng, "Anesthetic consideration for nonintubated VATS.," *J. Thorac. Dis.*, vol. 6, no. 1, pp. 10–3, Jan. 2014.
- [107] K.C. Chen, Y.-J. Cheng, M.-H. Hung, Y.-D. Tseng, and J.-S. Chen, "Nonintubated thoracoscopic surgery using regional anesthesia and vagal block and targeted sedation.," *J. Thorac. Dis.*, vol. 6, no. 1, pp. 31–6, Jan. 2014.
- [108] E. Pompeo, "State of the art and perspectives in non-intubated thoracic surgery," *Ann Transl Med*, vol. 2, no. 11, pp. 1–6, 2014.